T H E S E

présentée

à l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

- PARIS VI -

pour l'obtention

DU TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

Marie-Hélène CHARON

ETUDE DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ DE PEPTIDES HORMONAUX : SYNTHÈSE ET ÉTUDES D'ANTAGONISTES DE LA PENTAGASTRINE ET D'ANALOGUES RADIOACTIFS (^{3}H, ^{125}I).

soutenue le 17 décembre 1982 devant le jury composé de :

MM.	P. COHEN	Président
	C. LOUCHEUX	
	S. BONFILS	Examinateurs
	P. FROMAGEOT	

THESE

présentée

à l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

- PARIS VI -

pour l'obtention

DU TITRE DE DOCTEUR-INGENIEUR

par

Marie-Hélène CHARON

ETUDE DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITÉ DE PEPTIDES HORMONAUX : SYNTHÈSE ET ÉTUDES D'ANTAGONISTES DE LA PENTAGASTRINE ET D'ANALOGUES RADIOACTIFS (^{3}H, ^{125}I).

soutenue le 17 décembre 1982 devant le jury composé de :

MM.	P. COHEN	Président
	C. LOUCHEUX	
	S. BONFILS	Examinateurs
	P. FROMAGEOT	

Ce travail a été effectué principalement dans le Service de Biochimie (Département de Biologie) du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. Les études biologiques et radioimmunologiques ont été réalisées dans l'Unité de Recherche de Gastro-entérologie de l'Hôpital Bichat (Unité INSERM U 10).

Je remercie Monsieur J. COURSAGET de m'avoir accueillie dans son Département et j'exprime toute ma reconnaissance à Monsieur P. FROMAGEOT qui m'a permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions au sein de son Service.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur P. PHAM VAN CHUONG qui a bien voulu me confier cette étude et m'a guidée tout au long de ce travail par de nombreux conseils et encouragements, y consacrant beaucoup de temps et de dévouement.

Que Monsieur J.L. MORGAT, grâce à qui une partie de ce travail a pu être réalisée, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'exprime tout particulièrement ma reconnaissance à Mademoiselle M. DUBRASQUET (Hôpital Bichat) qui a largement participé, avec son équipe, à la réalisation des études biologiques et qui a bien voulu m'initier à ces techniques.

J'adresse également mes remerciements à Messieurs J.P. ACCARY et J.P. LAIGNEAU (Hôpital Bichat) pour leur aide et leurs conseils dans les études radioimmunologiques.

Je remercie beaucoup Monsieur P. COHEN d'avoir bien voulu présider le jury de cette thèse ainsi que Messieurs C. LOUCHEUX et S. BONFILS qui ont accepté de juger ce travail.

Enfin je tiens à remercier également tous ceux qui, par leur aide et leur soutien, m'ont aidé à titre divers pendant cette période passée dans le Service de Biochimie.

SOMMAIRE

- INTRODUCTION 1

I - RAPPELS ET GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTISECRÉTOIRES H^+ 7

I.1 - Les Anticholinergiques 12
I.2 - Les Antihistaminiques H_2 13
I.3 - Les Antigastriniques 16

I.3.1 - La Gastrine
I.3.2 - Les Antigastriniques

II - MATÉRIELS ET MÉTHODES 27

II.1 - Matériel 28

II.1.1 - Peptides et acides aminés
II.1.2 - Réactifs chimiques et solvants
II.1.3 - Produits radioactifs

II.2 - Méthode de purification par chromatographie liquide . 30

II.2.1 - Chromatographie liquide classique
II.2.2 - Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

II.3 - Techniques de mesure et d'analyse 31

II.3.1 - HPLC
II.3.2 - Chromatographie sur couche mince
II.3.3 - Analyses d'acides aminés
II.3.4 - Détermination du pH

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543515_0001

II.3.5 - Points de fusion
II.3.6 - Mesure de radioactivité
II.3.7 - Absorption (U.V.-visible, infrarouge)
II.3.8 - RMN du proton
II.3.9 - Dichroïsme circulaire
II.3.9.1 - Principe
II.3.9.2 - Mesure
II.4 - Méthodes d'études biologique et radioimmunologique . 38
II.4.1 - Mesures d'activité biologique
II.4.1.1 - Préparation du modèle
II.4.1.2 - Courbes dose-réponse
II.4.1.2.1 - Injection unique
II.4.1.2.2 - Plateau de secrétion
II.4.2 - Dosages radioimmunologiques

III - RÉSULTATS ET DISCUSSION 47

PREMIERE PARTIE : Recherche et Etude d'Antagonistes de la Pentagastrine

III.1 - Modifications du Tryptophane 48
III.1.1 - O-nitrophénylsulfényl-Pentagastrine (PGNPS) ... 48
III.1.1.1 - Rappels
III.1.1.1.1 - Synthèse
III.1.1.1.2 - Purification
III.1.1.1.3 - Activité biologique
III.1.1.1.4 - Résistance enzymatique
III.1.1.2 - Développement
III.1.1.2.1 - Synthèse
III.1.1.2.2 - Purification
III.1.1.2.3 - Etude conformationnelle par dichroïsme circulaire
III.1.1.2.4 - Modèle moléculaire

III.1.2 - Phénylsulfényl-Pentagastrine (PGPS) 61

III.1.2.1 - Préparation du Phénylthiochlorure PSCl

III.1.2.1.1 - Méthode de Lecher
III.1.2.1.2 - Méthode de Wieland et de Hopkins

III.1.2.2 - Caractérisation du PSCl

III.1.2.2.1 - Spectre Infrarouge
III.1.2.2.2 - Spectre de RMN du proton
III.1.2.2.3 - Absorption UV-visible

III.1.2.3 - Synthèse et caractérisation de la PGPS

III.1.2.3.1 - Synthèse et purification
III.1.2.3.2 - Spectre d'absorption UV-visble

III.1.2.4 - Etude conformationnelle par dichroîsme circulaire

III.1.2.5 - Etude biologique et radioimmunologique

III.1.2.5.1 - Activité biologique
III.1.2.5.2 - Dosage radioimmunologique

III.2 - Modification de l'acide aspartique 78

III.2.1 - (Aminosuccinyl^4)-Pentagastrine (PGAsu) 79

III.2.1.1 - Synthèse

III.2.1.1.1 - en milieu acide
III.2.1.1.2 - en milieu basique

III.2.1.1.2.1 - Etude préliminaire
III.2.1.1.2.2 - Préparation de PGAsu

III.2.1.2 - Etude conformationnelle par dichroîsme circulaire
III.2.1.3 - Activité biologique

III.2.1.3.1 - Recherche d'un effet agoniste
III.2.1.3.2 - Recherche d'un effet antagoniste

III.2.2 - Pentagastrine-Histamine (PG-Hist)............ 90

III.2.2.1 - Synthèse

III.2.2.1.1 - Essai de synthèse par l'anhydride mixte

III.2.2.1.2 - Mise au point du couplage par un carbodiimide

III.2.2.1.2.1 - Catalyse du couplage par le 1-hydroxybenzotriazole (OHBT)

III.2.2.1.2.2 - Comparaison des catalyseurs OHBT et OHsu

III.2.2.1.2.3 - Comparaison du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et du 1-cyclohexyl-3 (2-morpholinoéthyl)-carbodiimide (CMC)

III.2.2.1.3 - Couplage de l'Histamine à la Pentagastrine en présence de DCC et d'OHBT

III.2.2.2 - Etude conformationnelle par dichroîsme circulaire

III.2.2.3 - Activité biologique

III.2.2.3.1 - Recherche d'un effet agoniste

III.2.2.3.2 - Recherche d'un effet antagoniste

III.2.2.3.2.1 - vis-à-vis de la Pentagastrine

III.2.2.3.2.2 - vis-à-vis de l'Histamine

III.3 - Préparation d'un immunogène pour l'étude du métabolisme de l'antagoniste PGNPS 127

III.3.1 - Pentagastrine NPS-Histamine (PGNPS-Hist) 128

III.3.1.1 - Couplage de l'Histamine à la PGNPS

III.3.1.1.1 - PGNPS

III.3.1.1.2 - PGNPS-Histamine

III.3.1.2 - Fixation du groupement NPS sur la Pentagastrine-Histamine

III.3.1.3 - Synthèse de l'immunogène Pentagastrine NPS-Histamine-Benzidine-BSA

III.3.2 - Pentagastrine NPS-Histamine ^{3}H 135

DEUXIEME PARTIE : Synthèse de composés radioactifs nécessaires à l'étude pharmacologique de la Pentagastrine et de ses dérivés

- Introduction 139

III.4 - Synthèse des précurseurs et des peptides standard ... 142

III.4.1 - Synthèse de l'Hexagastrine (HG)

III.4.1.1 - Déprotection de la Pentagastrine

III.4.1.2 - Synthèse de HG (Boc-Tyr-PG)

III.4.2 - Synthèses de l'Hexagastrine mono ou diiodée (HGI et HGI_2)

III.4.2.1 - Synthèse de Boc-Tyr(I)-OPCP et Boc-Tyr(I_2)-OPCP

III.4.2.2 - Synthèse de HGI (Boc-Tyr(I)-PG) et de HGI_2 (Boc-Tyr(I_2)PG)

III.4.3 - Synthèse de l'Hexagastrine oxydée (HGox), de la monoiodohexagastrine oxydée (HGIox) et de la diiodohexagastrine oxydée (HGI_2ox)

III.5 - Caractérisation des composés de référence (HG, HGI, HGI_2, HGox, HGIox, HGI_2ox) 145

III.5.1 - Chromatographie sur couche mince

III.5.2 - Séparation des six composés par HPLC

III.5.3 - Activité biologique

III.5.3.1 - Effet de l'addition d'un résidu tyrosyle

III.5.3.2 - Effet de l'iodation

III.5.3.3 - Effet de l'oxydation

III.5.4 - Dosages radioimmunologiques

III.6 - Obtention d'Hexagastrine tritiée (^{3}H-HG) 157

III.6.1 - Tritation de HGI_2
III.6.2 - Contrôle par chromatographie sur couche mince
III.6.3 - Purification de ^{3}H-HG par HPLC
III.6.4 - Rendement et radioactivité spécifique
III.6.5 - Activité biologique et dosage radioimmunologique

III.7 - Obtention d'Hexagastrine marquée à l'Iode 125 (^{125}I-HG) 163

- Principe d'iodation par la Chloramine T
- Essais de marquage à l'Iode 125 de l'Hexagastrine par la Chloramine T

III.7.1 - Iodation de l'Hexagastrine par l'Iode 127 (non radioactif) 169

III.7.1.1 - sans protection par le DMSO
III.7.1.2 - en présence de DMSO

III.7.2 - Marquage radioactif de l'Hexagastrine à l'Iode 125 175

III.7.2.1 - essais avec traceur
III.7.2.2 - marquage

III.7.3 - Etude de la distribution tissulaire de la monoiodohexagastrine I^{125} in vivo chez le rat entier 192

III.7.3.1 - Analyse scintigraphique
III.7.3.2 - Analyse de la secrétion gastrique

III.7.3.2.1 - Dosage de l'acidité
III.7.3.2.2 - Analyse par HPLC des composés secrétés

III.7.3.3 - Comparaison avec la distribution de la G.17 iodée

IV - Conclusion 191

V - Bibliographie 194

VI - Résumé 204

INTRODUCTION

Les premiers travaux sur les mécanismes d'action des hormones polypeptidiques du tractus digestif ne sont apparus que depuis les deux dernières décennies bien que ces substances aient été découvertes au début du siècle.

L'isolement et la purification de ces hormones, ainsi que la mise au point des méthodes de mesure de leurs activités physiologiques, la recherche des organes cibles, ont constitué les premières étapes des études. Ensuite la découverte des structures primaires de ces peptides et les progrès accomplis dans le domaine de la synthèse peptidique ont orienté les recherches vers l'établissement de corrélations entre la structure chimique de l'hormone et son activité biologique, autrement dit vers l'abord des relations structure-activité.

La réponse biologique à une hormone est l'effet final observé après une succession d'événements. L'hormone doit d'abord, au niveau de la cellule cible, entrer en contact avec une structure spécifique, le récepteur. Celui-ci comporte formellement trois éléments fondamentaux : un site de reconnaissance auquel se lie l'hormone, un site signal qui recueille l'information portée par l'hormone et un site exécutif qui interagit avec un effecteur cellulaire contrôlant, par une série d'étapes amplificatrices, le déclenchement de l'activité biologique.

L'étude du mécanisme d'une hormone peut donc se faire principalement à deux niveaux, celui de l'interaction hormone-récepteur, comportant les deux volets: discrimination des formes

qui assurent la spécificité de liaison et des structures requises pour le déclenchement du signal, d'une part, ou celui de la réponse biologique finale observée d'autre part.

En l'état actuel de nos connaissances il est de règle que l'on ne sache pas discerner les phénomènes associés au site signal de ceux dépendant du site exécutif. Aussi est-on conduit à considérer la réponse biologique comme le paramètre mesurable intégrant un ensemble de phénomènes élémentaires et consécutifs.

Malgré ses imperfections de principe, une telle façon de procéder a permis de définir la notion d'antagoniste. Ainsi une substance est dite antagoniste lorsqu'elle réduit ou prévient l'effet de l'hormone considérée.

Une première classe d'antagonistes correspond à des composés capables de se lier au récepteur au même site de reconnaissance que l'hormone, mais incapables de transmettre au site signal l'information nécessaire au déclenchement ultérieur de la réponse biologique. De tels composés, occupant les mêmes récepteurs, entrent en compétition avec les agonistes et correspondent à des antagonistes compétitifs, dont l'efficacité est fonction de leurs affinités relatives.

Un autre groupe d'antagonistes réduit ou prévient l'effet d'une hormone en intervenant ailleurs qu'à son site de liaison spécifique. Le phénomène n'est plus compétitif.

L'antagonisme compétitif suppose qu'agonistes et antagonistes possèdent une analogie conformationnelle suffisante permettant leur fixation spécifique au même site de reconnaissance du récepteur. En conséquence, l'étude d'antagonistes compétitifs est un moyen pour déterminer les paramètres requis pour la fixation spécifique et ceux impliqués directement dans l'activation du site signal. Certaines méthodes physico-chimiques, comme la résonance magnétique nucléaire et le dichroïsme circulaire, permettent de déterminer la conformation adoptée par une

molécule dans un milieu donné. En particulier, il est aisé de comparer par dichroisme circulaire la conformation globale des peptides d'une série d'analogues. Dans la recherche d'antagonistes compétitifs cette technique permet donc de prévoir si une molécule donnée possède l'analogie conformationnelle nécessaire avec l'agoniste de référence pour pouvoir interagir avec son récepteur.

L'approche la plus logique pour obtenir cette analogie conformationnelle entre agoniste et antagoniste consiste à apporter des modifications ponctuelles à la molécule, examinant à la fois les répercussions conformationnelles, la liaison au récepteur et la réponse biologique.

Pour étudier directement la liaison hormone-récepteur il est nécessaire de réunir trois conditions :

1 - pouvoir détecter et mesurer la concentration de l'hormone considérée à des concentrations proches du niveau physiologique, c'est-à-dire de l'ordre du nanomolaire ou moins ;

2 - pouvoir distinguer les formes libres et liées de l'hormone au récepteur ;

3 - pouvoir discriminer la liaison spécifique au récepteur des liaisons non spécifiques au matériel biologique utilisé.

De tels objectifs supposent en premier lieu que l'on dispose d'analogues radioactifs conservant les propriétés hormonales, d'une parfaite pureté radiochimique, et d'une haute radioactivité spécifique permettant leur mesure. Grâce à ces hormones radioactives à haute activité spécifique on peut également étudier leur distribution tissulaire ou leur métabolisme.

En l'absence de l'une des trois conditions énoncées ci-dessus, on peut étudier indirectement les relations structure-activité par l'examen des courbes reliant la réponse biologique

à la quantité d'hormone et/ou de ses analogues offerte au système étudié. Cette méthodologie très utilisée par les pharmacologistes permet d'établir rapidement un premier classement des produits de la synthèse chimique.

Ainsi le présent travail a été réalisé dans le but de contribuer à l'élucidation du mode d'action d'une hormone polypeptidique importante dans la régulation physiologique de la secrétion gastrique acide: La Gastrine. Il a été abordé sous deux aspects qui constitueront les deux parties principales de ce mémoire :

- la recherche d'antagonistes de la Pentagastrine, segment actif de l'hormone, par modifications de certains de ses résidus, et l'étude de leur activité biologique.,

- la synthèse d'homologues radioactifs à haute activité spécifique par marquage d'un dérivé de la Pentagastrine, l'Hexagastrine, au Tritium ou à l'Iode-125.

ABREVIATIONS

$AcNH_4$	Acétate d'ammonium
-Asu-	Amino succinyl
B.A.W.	n-Butanol-Acide acétique-Eau (75/10/24)
Benz	Benzidine
BSA	Albumine de sérum bovin
CCM	Chromatographie sur couche mince
CMC	1-cyclohexyl-3(2-morpholinoéthyl)carbodiimide
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DMA	Diméthylacétamide
DMF	Diméthylformamide
E.P.A.W.	Acétate d'éthyle-Pyridine-Acide acétique-Eau (60/20/6/11)
EtoAc	Acétate d'éthyle
Hist	Histamine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
NMM	N-Méthylmorpholine
NPS	Nitrophénylsulfényle
OHBT	1-hydroxybenzotriazole
OHsu	Hydroxysuccinimide

P.S	Phénylsulfényle
RAS	Radioactivité spécifique
RIA	Dosage radioimmunologique
TEAP	Tampon triéthylaminephosphate
TFE	Trifluoroéthanol
TMD	4-4' tétraméthyldiaminodiphénylméthane

CHAPITRE I

RAPPELS ET GENERALITES SUR LES ANTISECRETOIRES H^+

I - RAPPELS ET GENERALITES SUR LES ANTISECRETOIRES H^+

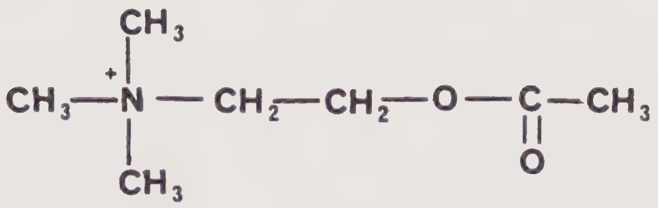
La secrétion d'acide chlorhydrique dans l'estomac par les cellules pariétales est stimulée par trois médiateurs principaux : l'Acétylcholine, l'Histamine et la Gastrine (figure 1).

L'Acétylcholine, produite au niveau de terminaisons nerveuses spécialisées agit soit au niveau de la paroi antrale gastrique sous l'effet de réflexes longs ou de stimuli mécaniques (distension antrale) ou chimiques (alcalinité du milieu) pour y stimuler la production de Gastrine, soit directement au niveau des cellules pariétales fundiques en se fixant à son récepteur spécifique.

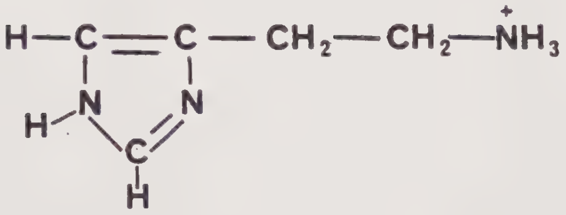
L'Histamine, présente dans la muqueuse gastrique de nombreuses espèces, est impliquée dans la régulation de la secrétion gastrique. Elle stimule la production d'acide chlorhydrique et cet effet est partiellement modulé par la Gastrine / 56 /.

La Gastrine, hormone polypeptidique, est libérée par les cellules G antrales et véhiculée par le sang pour venir agir au niveau des cellules pariétales du fundus et y activer la production d'acide. Cette libération de Gastrine est elle-même sensible à la stimulation cholinergique et au pH intragastrique ; en effet, lorsque le pH antral devient inférieur à 2 sous l'effet de l'acide chlorhydrique secrété par les glandes pariétales, il y a arrêt de la production de Gastrine (mécanisme de "feed-back") et donc en quelque sorte autorégulation de l'acidité gastrique.

Acétylcholine :



Histamine :



Gastrine :

PyroGlu—Gly—Pro—Trp—Leu—(Glu)$_5$—Ala—Tyr—Gly—Trp—Met—Asp—Phe NH_2

Figure 1 - Les trois principaux médiateurs de la secrétion gastrique acide.

Le mode d'implication de ces trois facteurs dans la régulation de la secrétion acide gastrique n'est pas encore défini. Deux théories, s'affrontant, ont été proposées :

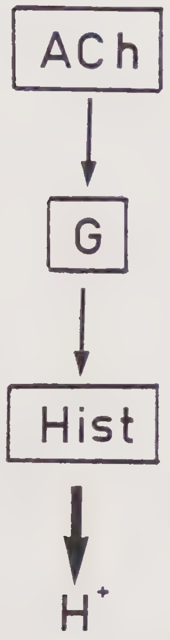
* L'une, suggérée par Mac Intosh / 46 / et défendue par Code / 19 / propose un schéma "séquentiel". La secrétion acide serait consécutive à des stimulations successives des récepteurs cholinergiques puis gastriniques, provoquant la libération d'Histamine (Schéma 1A). L'Histamine serait alors le médiateur final et unique de tous les stimulants.

* Une autre proposition, présentée par Grossman / 39 / décrit la régulation de secrétion gastrique par un schéma "parallèle" (Schéma 1B). La Gastrine (G), l'Acétylcholine (ACh) et l'Histamine (Hist) activeraient trois récepteurs distincts qui, à la suite d'interactions mal caractérisées, entraîneraient la libération d'acide chlorhydrique. Dans ce cas, les interactions postulées impliquent une proximité physique des trois récepteurs les uns à côté des autres sur la cellule pariétale.

Il semble ainsi que le contrôle de la secrétion acide dans l'estomac relève de mécanismes particulièrement complexes, à entrées multiples. Malgré son importance, notre compréhension de ces phénomènes est encore très limitée et bute sur nombre de données expérimentales contradictoires.

La recherche d'antisécrétoires H^+, agents susceptibles de s'opposer à la production d'acide chlorhydrique dans l'estomac, et tout particulièrement à sa production excessive et pathologique, constitue aujourd'hui la voie majeure des recherches en ce domaine, tant pour mieux disséquer les relations entre les stimulants des sécrétions gastriques que pour disposer de médicaments efficaces.

Dans cette double optique trois sortes de substances ont été recherchées : anticholinergiques, antihistaminiques et antigastriniques.



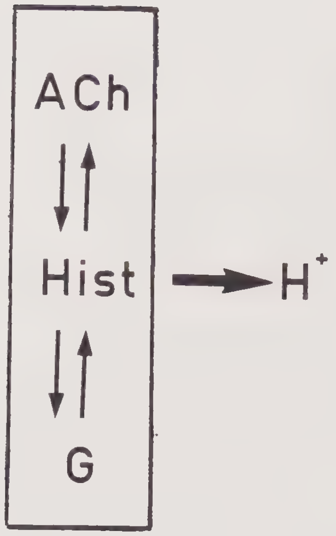


Schéma 1A

Schéma séquentiel

Schéma 1B

Schéma parallèle

Schéma 1 - Deux schémas hypothétiques de la régulation de la secrétion gastrique acide.

Nous rappellerons tout d'abord les résultats obtenus avec les deux premières familles qui ont été largement étudiées puis nous donnerons l'état d'avancement des recherches dans la troisième catégorie que nous avons voulu développer.

I.1 - LES ANTICHOLINERGIQUES

Aucun antagoniste réellement spécifique de l'acétylcholine, en ce qui concerne la secrétion gastrique acide, n'a été trouvé. Les inhibiteurs cholinergiques les plus étudiés (tels que l'Atropine et ses dérivés) se sont avérés stimulateurs de trop d'effets secondaires indésirables pour que cette catégorie d'antisecrétoires soit plus développée. Toutefois leur étude a pu apporter quelques renseignements concernant la nature des récepteurs cholinergiques muscariniques. En effet, d'après l'étude des relations structure-activité de ces inhibiteurs plusieurs caractères communs aux différents types de récepteurs cholinergiques rencontrés ont été proposés, notamment par Beckett / 8 / et Kier / 47, 48 / :

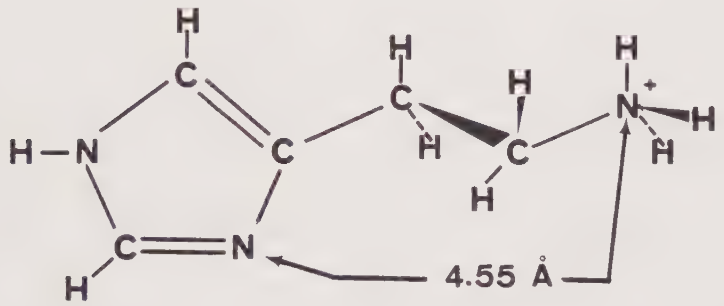
- l'existence d'un centre anionique sur le récepteur équilibrant l'ammonium quaternaire de l'acétylcholine ;
- la présence de deux sites positifs s'associant d'une part au groupement carbonyle et d'autre part à la fonction ester.

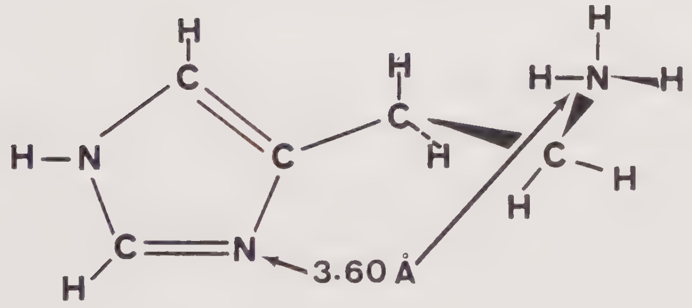
Ces différentes charges seraient positionnées à des distances bien déterminées les unes des autres.

Pour Beers et Reich / 9 / le site positif du récepteur serait unique et constitué d'un groupe donneur de protons réalisant une liaison hydrogène avec un accepteur (C = O ou - O -) comportant une paire d'electrons non appariée .

I.2 - LES ANTIHISTAMINIQUES H_2

En étudiant les exigences structurales requises pour le récepteur histaminergique, dans le cas de différentes activités biologiques répondant à une stimulation histaminique, Ash et Schild / 5 / sont arrivés les premiers à la conclusion qu'il existait au moins deux types de récepteurs histaminergiques, récepteur H_1 et récepteur H_2, et Kier / 48 / a montré par des calculs d'orbitales moléculaires que l'histamine peut exister sous deux formes conformationnelles en équilibre qui diffèrent par la distance entre l'ammonium quaternaire et l'atome d'azote du cycle imidazole :

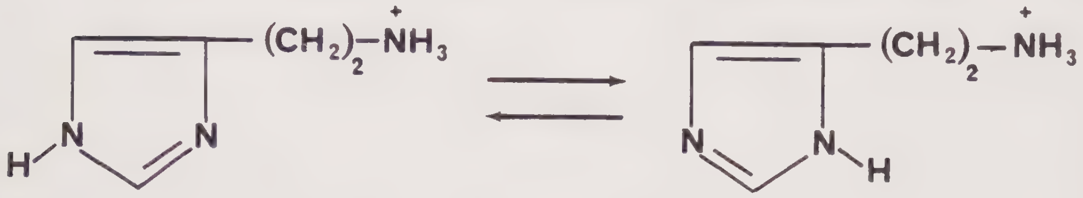




Le récepteur H_1 correspondrait à la forme ($N - N^+$: 4,55 Å) tandis que le récepteur H_2 correspondrait à la forme ($N - N^+$: 3,60 Å).

Ainsi l'Histamine, selon la conformation adoptée, pourrait entraîner deux catégories de réponses biologiques distinctes correspondant à l'interaction préférentielle avec l'un ou l'autre des récepteurs.

Par ailleurs, l'Histamine monocationique peut exister sous deux formes tautomériques : les tautomères N^{π} et N^{τ} (Schéma 2) :



N^{τ} tautomère N^{π} tautomère

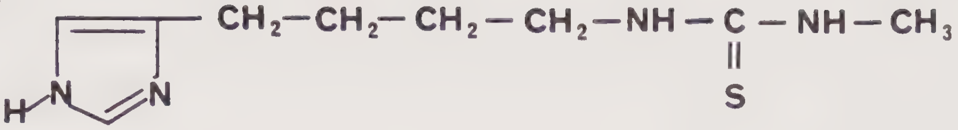
Schéma 2 - Tautomérisation de l'Histamine.

Durant et al. / 23 / ont avancé l'hypothèse que les agonistes H_1, contrairement aux agonistes H_2, ne nécessiteraient pas ce tautomérisme de l'imidazole.

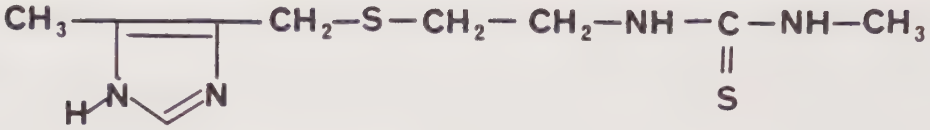
Dans le cas de la secrétion H^+ ce sont les récepteurs H_2 qui sont impliqués spécifiquement. Leur existence a en effet été démontrée par la découverte, par Block et al. / 11 / du premier anti-histaminique H_2, le Burimamide, inhibiteur spécifique et compétitif de la stimulation d'acide par l'Histamine (figure 2).

Puis en remplaçant un des groupements méthylène de la chaîne latérale par une liaison thio-éther ces auteurs ont montré que le dérivé obtenu, le métiamide, avait une meilleure affinité pour les récepteurs H_2 / 12 / et était donc un anti-histaminique H_2 plus puissant. Mais la toxicité de ces composés, due à la présence du radical thiourée à l'extrémité de la chaîne

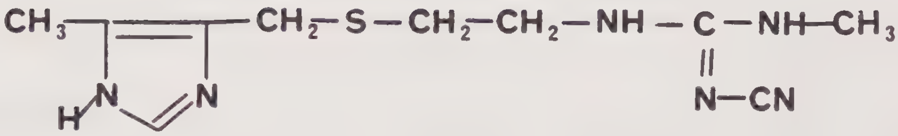
Burimamide



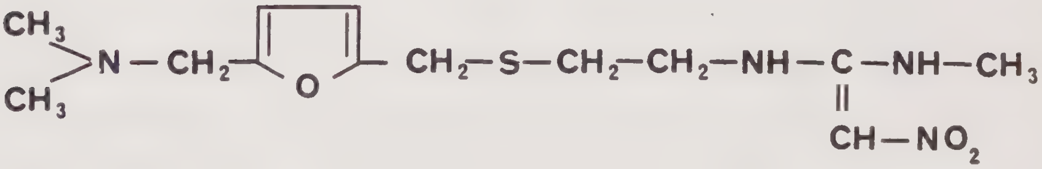
Métiamide



Cimétidine



Ranitidine



Tiotidine

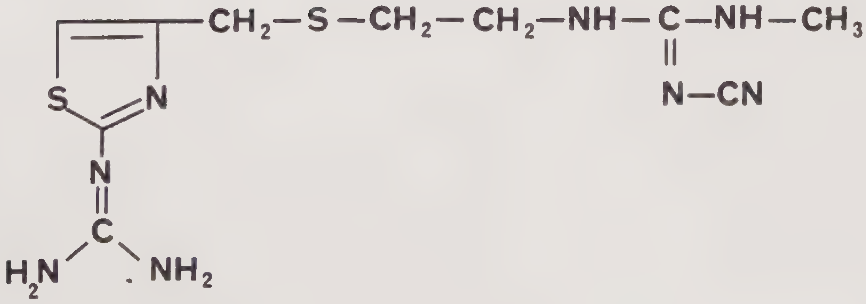


Figure 2 - Antihistamiques H_2

latérale, a motivé la synthèse de nouveaux dérivés, dont la Cimétidine, où le radical thiourée est remplacé par un radical cyanoguanidine. La Cimétidine est actuellement l'antihistaminique H_2 présentant le moins d'effets secondaires nocifs.

L'étude des relations structure-activité de ces antagonistes et d'agonistes de l'Histamine avait conduit aux conclusions suivantes / 56 / :

- pour que le récepteur H_2 soit activé la chaîne latérale doit être chargée et le cycle imidazole doit conserver sa possibilité de tautomérisme de la fonction amidine, le tautomère N^{τ} étant le seul actif.

- le pouvoir antagoniste des antihistaminiques H_2 est dû principalement à la neutralité de la chaîne latérale et à la préservation du tautomérisme du noyau imidazole.

Cependant la découverte récente de deux autres antihistaminiques H_2 puissants, la Ranitidine et la Tiotidine, possédant respectivement un noyau furane et un noyau thiazol, remet en question le caractère indispendable du noyau imidazole pour la fixation au récepteur H_2. On peut penser que la condition nécessaire requise pour la fixation au récepteur n'est pas spécifiquement le noyau imidazole mais plutôt une certaine densité de charge localisée à une position déterminée.

I.3 - LES ANTIGASTRINIQUES

Les anticholinergiques et surtout les antihistaminiques ont pu apporter de précieux renseignements nécessaires à l'étude du mécanisme d'action des stimulations de la sécrétion gastrique acide, notamment en permettant de définir des corrélations entre les différents groupements de ces molécules et leurs propriétés biologiques, et en contribuant ainsi à l'étude des récepteurs à acétylcholine et à histamine.

La troisième catégorie d'antisecrétoires H^+, les antigastriniques, permettra une approche plus précise du récepteur spécifique de la Gastrine et du rôle particulier de cette hormone dans la régulation de la secrétion acide.

Au point de vue thérapeutique les antigastriniques représentent un intérêt particulier dû au fait que dans certains cas pathologiques comme celui du Syndrôme de Zollinger-Ellinson, l'hypersecrétion acide responsable des ulcères gastroduodénaux est due à une hyperproduction de Gastrine non contrôlée par le mécanisme de "feed-back" antral puisque l'hormone est alors libérée par des cellules du pancréas.

Pour pouvoir aborder les antigastriniques, il est nécessaire au préalable de rappeler l'état des connaissances sur la Gastrine.

I.3.1 - La Gastrine et son site actif

Après la découverte de l'existence de la Gastrine en tant qu'hormone par Edkins en 1905 / 26 / ce polypeptide a été isolé tout d'abord de l'antre de porc par Grégory R.A. et Tracy / 37 / puis chez d'autres espèces et dans d'autres tissus. Elle a été ainsi trouvée sous diverses formes moléculaires :

- un heptadécapeptide amide (G.17 ou "little" Gastrine) / 26, 37 / prépondérant dans la muqueuse antrale / 10 / ;
- un peptide plus grand contenant 17 acides aminés supplémentaires liés à la G.17 (G.34 ou "big" Gastrine) / 38 / prépondérant dans la muqueuse duodénale / 10 / ;
- une macromolécule dont la structure n'est pas complètement caractérisée ("big big" Gastrine) / 90 / qui est probablement le précurseur des formes plus petites / 91 /.

Au niveau des sites cellulaires réceptifs la forme physiologiques active de la Gastrine est probablement la G.17.

Elle existe sous deux formes : GI et GII, le groupement phénol de la Tyrosine en position 12 étant estérifié par l'acide sulfurique dans la Gastrine II (figure 4).

Les G.17 isolées de différentes espèces possèdent toutes le même pouvoir stimulateur de la secrétion acide. Or elles possèdent toutes le même heptapeptide C-terminal et ne diffèrent que par 1 ou 2 substitutions dans le reste de la molécule (figure 5). Leur activité biologique semble donc provenir de l'extrêmité C-terminale. En effet, Tracy et Gregory / 85 / ont montré que le tétrapeptide C-terminal est le fragment minimal pouvant, à lui seul, reproduire l'ensemble des actions physiologiques de la Gastrine (non seulement la secrétion d'acide chlorhydrique mais également celle de pepsine, la motilité gastrique et intestinale, la secrétion pancréatique). Désigné sous le nom de Tétragastrine, ce fragment constitue le segment actif de la Gastrine :

Tétragastrine : Trp - Met - Asp - Phe - NH_2
(segment actif)

Le reste de la molécule contribue à potentialiser l'action du segment C-terminal en accroissant l'affinité de l'hormone pour ses sites récepteurs et en participant à son transport et à sa protection contre les enzymes peptidolytiques.

La Pentagastrine, constituée par ce tétrapeptide bloqué à son extrémité N-terminale par un groupement butyloxycarbonyl β-alanine, est considérée comme analogue de la Gastrine et utilisée en tant que tel pour les différentes études pharmacologiques :

Pentagastrine : Boc - βAla - Trp - Met - Asp - Phe - NH_2
(Peptide de synthèse)

L'hypothèse d'un fragment minimal tétrapeptidique soutenue par Tracy et Gregory / 85 / a été cependant controversée

PYR-GLY-PRO-TRP-LEU-GLU-GLU-GLU-GLU-GLU-ALA-TYR-GLY-TRP-MET-ASP-PHE-NH_2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 13 14 15 16 17

EXTRÉMITÉ N TERMINALE ———————— EXTRÉMITÉ C TERMINALE

↑

ACIDE AMINÉ EN POSITION 12

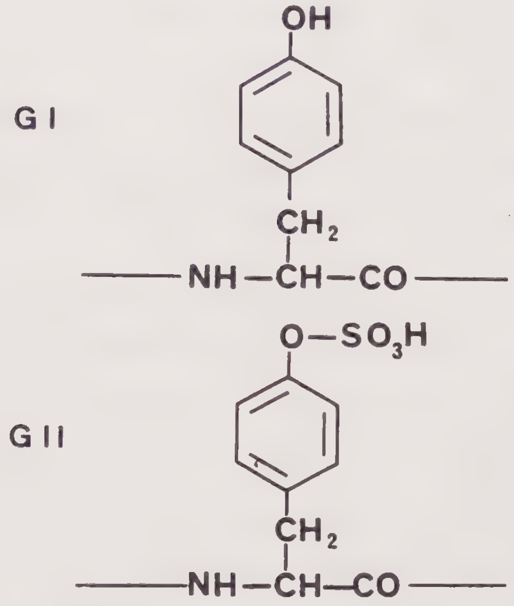


Figure 3 - Formule de la Gastrine G.17 chez l'homme.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
HOMME	PYR	GLY	PRO	TRP	LEU	GLU	GLU	GLU	GLU	GLU	ALA	TYR	GLY	TRP	MET	ASP	PHE	NH_2
PORC	--	--	--	--	MET	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
CHAT	--	--	--	--	--	--	--	--	--	ALA	--	--	--	--	--	--	--	--
CHIEN	--	--	--	--	MET	--	--	ALA	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
VACHE-MOUTON	--	--	--	--	VAL	--	--	--	--	ALA	--	--	--	--	--	--	--	--

Figure 4 - Structure des Gastrines G.17 dans différentes espèces animales.

par Lin / 57 / qui observe une stimulation de secrétion acide par le tripeptide Met-Asp-PheNH$_2$ et en déduit que la Tryptophane de la Tétragastrine n'est pas indispensable aux actions "gastrine-like". Il faut toutefois noter qu'il doit administrer 3 000 fois plus du tripeptide que du tétrapeptide pour obtenir la même réponse secrétoire. A des concentrations si élevées il est possible que d'autres phénomènes entrent en jeu.

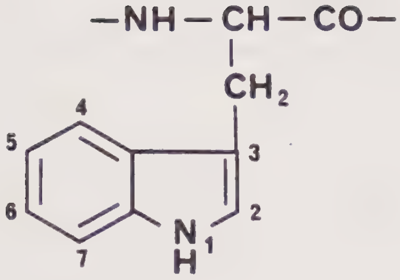
Pour déterminer le rôle de chacun des acides aminés de la Tétragastrine, Morley a synthétisé un grand nombre de dérivés de ce tétrapeptide et mesuré leur pouvoir agoniste / 65 /.

Il a alors conclu d'une première approche que Tryptophane, Méthionine et Phénylalanine étaient impliqués dans la reconnaissance du tétrapeptide par le récepteur et servaient de sites de fixation tandis que l'acide aspartique remplissait un rôle fonctionnel dans l'activation du récepteur. Selon son hypothèse, l'acide aspartique est indispensable au déclenchement de l'activité biologique et toute modification de ce résidu entraîne la perte de l'activité biologique du peptide.

Morley en a alors proposé un premier modèle de récepteur gastrinique constitué d'une cavité linéaire pour le squelette peptidique, dont le rôle serait principalement de maintenir un espace correct entre les chaînes latérales des résidus, et de "poches" spécifiques de chacune des chaînes latérales, qui se partagent les rôles de sites de fixation et d'activation.

Depuis, Morley lui-même et d'autres auteurs ont apporté des modifications à cette analyse à l'issue d'études de nouveaux dérivés synthétisés plus récemment et leurs résultats sont en contradiction avec le modèle initialement proposé.

Ainsi la poche réceptrice du Tryptophane non seulement doit permettre une certaine liberté conformationnelle pour recevoir les dérivés (4- ou 6-Méthyl) Trp qui sont actifs / 65 /



mais doit également posséder un groupement capable de se lier au proton NH de l'indole car le remplacement du NH indolique par -N-CH_3,-S ou -O, conduit à des composés inactifs / 67 /.

D'autre part, la poche réceptrice du résidu Asp doit être très spécifique puisque, par exemple, le remplacement de Asp par Glu, Asn, ou Ser conduit à des dérivés inactifs / 65 /. Néanmoins, le dérivé où le β-carboxyl de Asp est remplacé par le tétrazol-5-yl est actif / 66 /. Pour expliquer cette exception Morley avance l'hypothèse de la préservation du caractère électronique de ce composé.

Quant au rôle du squelette peptidique il est non seulement de maintenir un espace correct entre les chaînes latérales mais également de contribuer au signal de déclenchement de la stimulation gastrique, par l'une des trois liaisons peptidiques (Trp-Met, Met-Asp, Asp-Phe) puisque le dérivé rétroénantiomère de la Tétragastrine n'est ni agoniste ni antagoniste / 41 /.

Le fait que le rétroénantiomère ne soit pas antagoniste ne peut pas être expliqué par le modèle de Morley.

En effet, si le squelette peptidique était linéaire la seule différence entre ce dérivé et la Tétragastrine serait due à l'inversion des groupements CO et NH du squelette, les chaînes latérales conservant leur position et leur orientation. Dans ce cas le dérivé rétroénantiomère devrait être reconnu par le récepteur et être au moins antagoniste, ce qui n'est pas le cas.

Par ailleurs, l'absence de pouvoir stimulant ou inhibiteur des dérivés aza (où le C_α est remplacé par N), dont (aza-Asp)- ou (aza-Phe)-Tetragastrine amène Morley / 24 / à en conclure l'importance des paramètres conformationnels requis

au niveau du récepteur, la chaîne latérale des composés aza étant dans une position intermédiaire entre celles des résidus L et D.

Si la Tétragastrine adoptait une conformation linéaire, elle devrait, étant donné sa petite taille, être flexible en solution. Dans ce cas son spectre de dichroïsme circulaire (DC) résulterait simplement de la somme des contributions individuelles des résidus. Or les résultats de DC obtenus au laboratoire / 73 / montrent que la Tétragastrine en solution dans un solvant amphiphile (comme le Trifluoroéthanol qui présente des analogies avec l'environnement d'une protéine membranaire) présente une certaine rigidité, assurée probablement par des interactions entre les chaînes latérales hydrophobes et aromatiques (Trp et Phe) et impliquant une structure repliée du squelette peptidique. La construction de modèles moléculaires en accord avec les données expérimentales conduit à une molécule compacte présentant une région hydrophobe formée par les chaînes latérales des résidus Trp, Met et Phe. S'il en était ainsi, le site récepteur ne comporterait plus les quatre poches individuelles mais une seule cavité contenant une région hydrophobe.

La conformation repliée et compacte proposée pour la Tétragastrine correspond à celle de plus faible énergie, donc la plus probable, calculée par optimisation de l'énergie conformationnelle des différentes structures types (hélice α, β étendu, coude β, coude γ, C_7 ...) / 1 /.

Ces calculs ont permis de proposer un modèle plus précis de la conformation active de la Tétragastrine au niveau du récepteur.

Ce modèle montre (figure 5) que le tétrapeptide actif présente une forme globale qui pourrait être inscrite dans une ellipsoïde de longueur 15-16 Å (distance N- C terminaux) et de

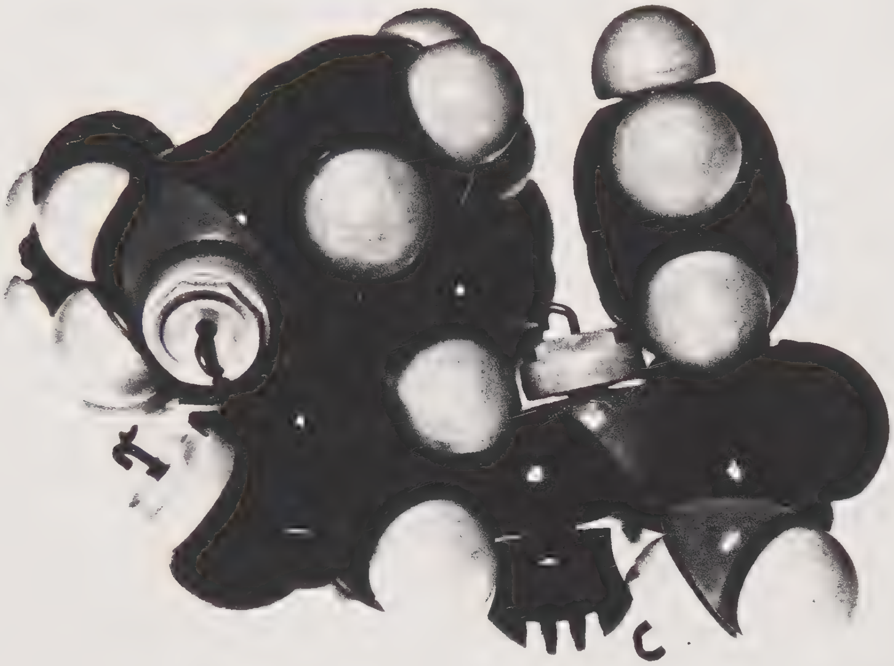


Figure 5 - Modèle moléculaire de la Tétragastrine.

largeur 12-14 Å. On distingue nettement deux régions : une région hydrophobe formée par les chaînes latérales de Trp, Met et Phe (distance des centres des noyaux indole-benzyle ≅ 5 Å) et une région hydrophile formée par la chaîne peptidique, la chaîne latérale de Asp et l'amide C-terminal. La structure compacte de la molécule est maintenue d'une part par l'interaction hydrophobe des trois chaînes latérales et d'autre part par les forces associées au repliement du squelette peptidique au niveau du résidu Asp.

Le site récepteur comporterait deux surfaces, l'une hydrophobe qui pourrait constituer le site de reconnaissance et l'autre, hydrophile, où l'interaction de fonctions complémentaires du récepteur et de l'hormone donnerait le signal de déclenchement des réactions conduisant à la réponse biologique. Il est même concevable que ces deux parties appartiennent à des récepteurs différents que la Tétragastrine permettrait d'associer, soit selon le schéma de Mac Intosh, soit selon celui de Grossman.

Ce modèle a permis de fournir des corrélations assez bonnes entre conformation et activité / 1, 71 / d'analogues de synthèse de la Tétragastrine / 71, 65, 42 /.

Il permet de rechercher les modifications possibles du tétrapeptide qui n'exigent ou n'induisent pas un changement de conformation et de voir quelles conséquences elles peuvent avoir sur l'accessibilité de certains sites. Inversement il permet d'analyser les raisons de certains effets biologiques observés, notamment dans le cas d'antagonisme.

Toutes les études réalisées par Morley sur des dérivés de la Tétragastrine auraient pu fournir des renseignements beaucoup plus complets sur les sites nécessaires au déclenchement de l'activité biologique et ceux impliqués simplement dans la fixation au récepteur si des antagonistes de la Gastrine ou

de son segment actif (antagonistes de la Pentagastrine par exemple) avaient été connus.

I.3.2 - Les antigastriniques

Le premier dérivé de la famille des antigastriniques a été découvert fortuitement / 35 /. Il s'agit de l' (ortho-nitrophénylsulfényl-Trp^{14})-Gastrine ou Gastrine NPS. Ce dérivé possédant un groupement NPS en C_2 du noyau indole du Tryptophane inhibe de façon spécifique et compétitive la secrétion stimulée par la Gastrine in vivo et déplace la Gastrine marquée fixée à son récepteur sur des cellules isolées / 82 / ce qui confirme le caractère d'antagoniste compétitif de ce dérivé.

Pour des raisons économiques (la synthèse de la Gastrine entière étant longue et onéreuse) la même modification a été réalisée sur la Pentagastrine. Une étude très poussée des propriétés biologiques de la Pentagastrine NPS / 69, 22, 72 / a montré que ce dérivé était lui aussi un antagoniste compétitif de la Pentagastrine.

D'après notre modèle conformationnel de la TG on peut penser que l'antagonisme des dérivés NPS est dû à l'encombrement du groupement NPS qui masquerait un site de fixation important pour le déclenchement de la réponse secrétoire.

La voie de recherche d'antigastriniques ouverte par ces dérivés à Tryptophane modifié s'avère prometteuse. Nous avons donc voulu la développer en cherchant notamment à expliquer le rôle du groupement NPS.

De même l'étude des relations structure-activité du fragment C-terminal de la Gastrine a montré que l'acide aspartique joue un rôle important dans le déclenchement de l'activité biologique. Des modifications du résidu aspartique pourraient ainsi conduire à des antagonistes intéressants. Nous avons également exploré cette voie.

L'utilisation d'analogue radioactif est un des outils les plus efficaces pour étudier la fixation d'un peptide à son récepteur (fixation sur des membranes ou des cellules isolées, distribution tissulaire) ou son métabolisme dans l'organisme (dosage radioimmunologique). L'étude de la Pentagastrine et de ses dérivés nécessite ce genre de composé. Nous nous sommes donc proposés de synthétiser des analogues de la Pentagastrine à haute radioactivité spécifique.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II - MATERIELS ET METHODES

II.1 - MATÉRIELS

II.1.1 - Peptides et acides aminés

La Pentagastrine Boc-βAla-Trp-Met-Asp-Phe NH_2 a été achetée chez Impérial Chemical Industries (GB) ou chez Pierce (USA). Les différents acides aminés et leurs dérivés proviennent de chez Sigma (USA) ou Bachem (CH).

II.1.2 - Réactifs chimiques et solvants

Les carbodiimides utilisés pour les synthèses peptidiques proviennent de chez Sigma ou Calbiochem. Le 1-hydroxybenzotriazole est fourni par Protein Research Foundation et la chloramine T vient de chez Fluka AG. Les réactifs de révélation pour chromatographie sur couche mince, 4-Diméthylaminobenzaldéhyde et 4-4'-Tétraméthyldiaminodiphénylméthane proviennent également de chez Fluka.

Les autres réactifs courants sont achetés chez Merck ou Prolabo ainsi que les solvants de synthèse, de pureté analytique. Le Diméthylformamide et la Triéthylamine sont redistillés avant usage. Le trifluoroéthanol utilisé pour les études de dichroïsme circulaire est de qualité spectroscopique (Urasol, Merck).

II.1.3 - Produits radioactifs

Le Commissariat à l'Energie Atomique nous a fourni le gaz Tritium ainsi que l'Histamine tritiée ou marquée au ^{14}C. L'Iode-125 provient de chez Amersham International Limited.

La tritiation de peptide est réalisée, dans un laboratoire spécialement surveillé, à l'aide d'un banc de tritiation conçu par Morgat et al. / 64 / (figure 6).

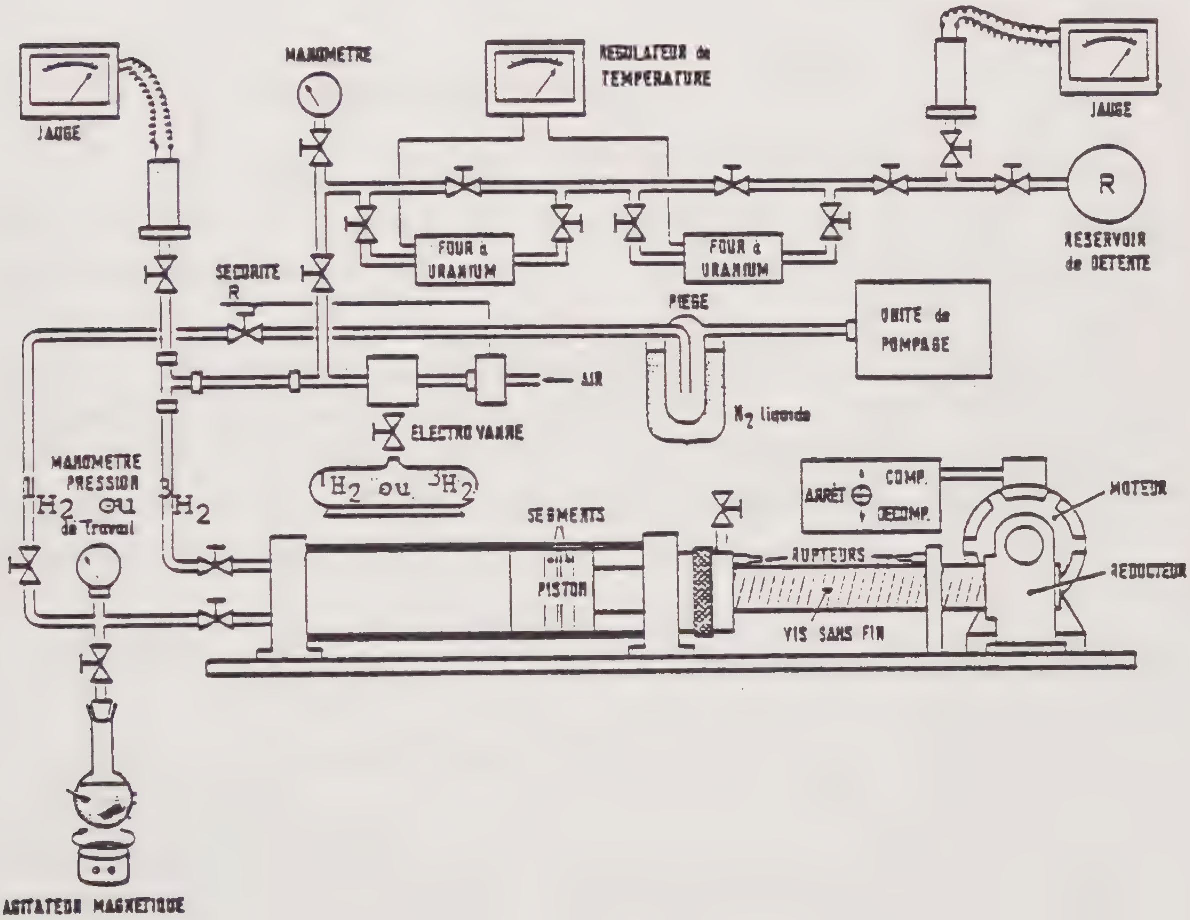


Figure 6 - Dispositif automatique de transfert de gaz.

Ce dispositif, réalisé en acier inoxydable, présente l'intérêt de ne mettre en oeuvre aucune graisse ou lubrifiant. Il est étanche et permet d'obtenir tout d'abord un vide poussé (10^{-5} torr) dans le réacteur puis d'introduire le gaz tritium en continu et sous pression contrôlée.

Les marquages à l'Iode-125 sont réalisés en boîte à gants dans une zone contrôlée.

II.2 - MÉTHODE DE PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE

II.2.1 - Chromatographie liquide classique

Ces chromatographies sont réalisées dans des colonnes en verre sur un support soit de Silice 60 (70-230 Mesh, Merck), soit de Séphadex LH 20 (25-100 µ, Pharmacia Fine Chemicals).

Les éluats sont analysés en continu par la mesure de la densité optique à 280 nm (cellule ISCO à double faisceau type 4, unité optique ISCO UA-4) enregistrée sur un appareil Philips PM 8100, et sont recueillis dans un collecteur de fraction LKB Ultra rac 7000.

II.2.2 - Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La purification par HPLC des peptides synthétisés est réalisée dans des colonnes en acier, analytique (L = 30 cm, Ø = 4,5 mm) ou préparative (L = 30 cm, Ø = 11 mm) selon la quantité préparée, contenant comme support soit de la silice (Lichroprep S60, 5-20 µ, Merck), soit de la silice greffée (phase inverse, Partisil 10-ODS-2, Whatman, ou µBondapak C18).

La chromatographie est contrôlée par un système Waters comprenant un injecteur automatique (Wisp 710 B), deux pompes (6000 A et M 45), un System Controller 720 et un enregistreur intégrateur M 730.

Des programmes de gradient de solvants d'élution peuvent être réalisés à volonté.

La détection des produits élués se fait en continu par absorption optique (détecteur UV Pye Unicam à longueur d'onde variable), à 280 nm, 254 nm ou 215 nm, selon que le composé analysé contient respectivement du Tryptophane, de la Phénylalanine comme seul acide aminé, ou aucun acide aminé aromatique. L'intégration des pics détectés permet le calcul du pourcentage des différents produits élués.

En cas d'analyse ou de purification de produits radioactifs la solution éluée en sortie de colonne est collectée par fraction de 1 mn (collecteur Redirac) et le comptage de chaque fraction est effectué en suivant, selon les cas, la radioactivité ^{3}H, ^{125}I ou ^{14}C.

Un exemple de rapport fourni par ce système Waters est représenté sur la figure 7 dans le cas de la séparation successive des six composés suivants : hexagastrine oxydée, monoiodohexagastrine oxydée, hexagastrine, diiodohexagastrine oxydée, monoiodohexagastrine et diiodohexagastrine.

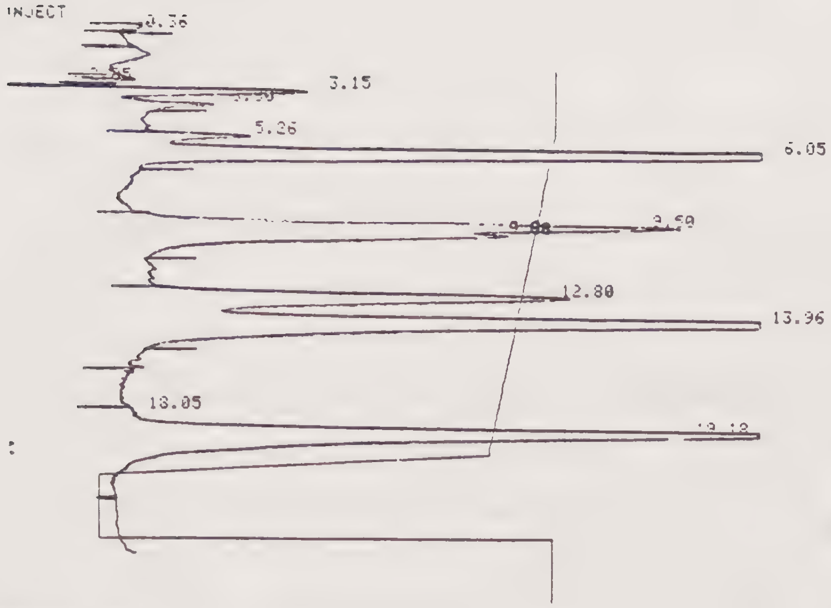
II.3 - TECHNIQUES DE MESURE ET D'ANALYSE

II.3.1 - HPLC

L'analyse des peptides synthétisés et le contrôle de leur pureté sont réalisés par chromatographie HPLC sur colonne analytique (L = 30 cm, Ø = 4,5 mm) avec la même installation que pour leur purification.

II.3.2 - Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince se réalise sur des plaques en verre avec support de Silica Gel 60 F-254 (Merck) ou LK6 DF (Whatman) à indicateur de fluorescence.



OPERATOR: MHC

SAMPLE NAME:

----------- PUMP CONTROLLER CONDITIONS ---------

STANDBY CONDITIONS FOR RUN SET 38

PRESSURE: 1614 DELAY TIME: 0
HIGH LIMIT: 4500 PLOT %A
LOW LIMIT: 0

PUMP	SOLVENT	COMP
A	ACN/ACNH4 19	L
B	ACN/ACNH4 99	0
C		0

INITIAL CONDITIONS/GRADIENT TABLE

TIME	FLOW	%A	%B	%C	CURVE
INITIAL	1.20	70	30	0	*
3.00	1.20	70	30	0	06
18.00	1.20	60	40	0	06
19.00	1.20	0	100	0	06
22.00	1.20	0	100	0	06
25.00	1.20	70	30	0	01

EXTERNAL EVENTS

NO. DESCRIPTION

TIME NO. STATUS

NOV. 3, 1981 10:35:56 CHART 0.50 CM/MIN
RUN #2 CALC #0
COLUMN SOLVENT OPR ID: 5

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA		RF
	4.06000	0.36		4060	L	0.000000E0
	978.03600	3.15		978036	F	0.000000E0
	312.16100	3.30		312161	L	0.000000E0
	584.10300	5.26		584103	F	0.000000E0
	8934.08000	6.05		8934131	L	0.000000E0
	4211.26000	9.50		4211283	F	0.000000E0
	2611.00000	9.88		2611009	L	0.000000E0
	4358.89000	12.80		4358910	F	0.000000E0
	9053.59000	13.96		9053639	L	0.000000E0
	110.76300	18.05		110763	F	0.000000E0
	3849.12000	19.18		3849165	L	0.000000E0
TOTAL	44895.50000					

Figure 7 - Exemple de rapport fourni par le système HPLC Waters dans le cas de la séparation de l'Hexagastrine et de ses dérivés iodés et/ou oxydés .

Les produits sont révélés :

- par lumière ultra-violette à 254 nm (Lampe Desaga UBIS),
- par la ninhydrine (solution à 1 % dans l'acétone) pour révéler les amines primaires,
- par le réactif d'Ehrlich (4-diméthylaminobenzaldéhyde) pour les peptides contenant du Tryptophane,
- par le TMD (4-4'-tétraméthyldiaminodiphénylméthane) en présence de chlore et d'iodure de potassium, pour tous les composés possédant au moins un atome d'hydrogène échangeable sur un atome d'azote, donc tous les petides étudiés.

Les produits radioactifs sont également révélés par autoradiographie sur film Kodirex des plaques chromatographiques et par les radioenregistrements de ces plaques effectuées par un Scanner II LB 2723 couplé à un intégrateur LB 242 K (Berthold).

II.3.3 - Analyses d'acides aminés

Les peptides lyophilisés en présence de 10 nmoles de Norleucine comme référence, sont hydrolysés par 1 ml HCl 6N pendant 24 heures à 110°C, en ampoules scellées sous vide et en présence de 2 % d'acide thioglycolique afin de protéger le Tryptophane particulièrement sensible à l'hydrolyse acide.

L'hydrolysat est ensuite analysé par un autoanalyseur Technicon (T.S.M.). Cette méthode, après étalonnage, permet l'analyse qualitative et quantitative de chacun des acides aminés du peptide soumis à l'hydrolyse.

II.3.4 - Détermination du pH

Le pH des solutions est mesuré à 21°C sur un appareil Tacussel PHN 75 étalonné avec des solutions Radiometer.

II.3.5 - Points de fusion

Les points de fusion sont mesurés sur un appareil Mettler FP 5 équipé d'un four FP 51 qui permet l'étude simultanée de trois échantillons placés dans des capillaires et d'une plaque chauffante FP 52 qui, placée sous un microscope optique, permet d'observer éventuellement la dénaturation du produit. Les montées et descentes en température peuvent être effectuées à différentes vitesses : 0,2 , 1 , 2 , 3 et 10°C/mn.

II.3.6 - Mesure de radioactivité

Les radioactivités ^{3}H et ^{14}C sont détectées par scintillation liquide dans du Lumagel à l'aide d'un compteur Intertechnique SL 30. Le rendement de l'appareil est de 30 %.

La radioactivité ^{125}I est mesurée par un compteur Intertechnique CG 4000, dont le rendement est de 60 %.

II.3.7 - Absorption (UV-visible, Infrarouge)

Les spectres d'absorption dans le visible et l'ultraviolet sont obtenus à l'aide d'un spectromètre Cary 210 ou un Zeiss DMR 20. L'intensité et le positionnement des bandes d'absorption permettent d'identifier les produits et d'évaluer leurs concentration (après détermination du coefficient d'absorption molaire correspondant).

Les spectres infra-rouges sont réalisés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 521.

II.3.8 - RMN du proton

Les spectres de résonance magnétique du proton ont été enregistrés à 60 MHz en utilisant un spectromètre Perkin-Elmer R 12. Les mesures sont faites à température ambiante (21°C) et nous avons utilisé le Tétraméthylsilane comme référence interne pour fixer l'origine des fréquences.

II.3.9 - Dichroïsme circulaire

La technique de dichroïsme circulaire consiste à mesurer la différence d'absorption par un milieu donné d'une lumière monochromatique polarisée circulairement à droite et à gauche.

Elle fournit des informations sur la géométrie des chromophores et les interactions, par l'asymétrie induite, auxquelles ces chromophores sont soumis. Les données acquises, bien que pas toujours univoques, aident à décrire la ou les conformation(s) de la molécule étudiée.

II.3.9.1 - Principe

Les vecteurs $\vec{E}_D$ et $\vec{E}_G$ correspondant respectivement aux rayons lumineux polarisés circulairement à droite et à gauche sont caractérisés par leur amplitude et leur vitesse angulaire. Ces deux paramètres ne sont pas identiques pour les deux vecteurs losqu'ils traversent un milieu optiquement actif et l'absorption dichroïque $\Delta\varepsilon$ d'un tel milieu traduit cette différence.

Le degré d'asymétrie d'un groupement responsable de l'activité optique peut être estimé par la force rotationnelle R_{oe} de la transition correspondante de l'état fondamental (o) à un état excité (e). Cette force rotationnelle est fonction des moments dipolaires électrique ($\vec{\mu}_e$) et magnétique ($\vec{\mu}_m$) de la transition considérée.

Les signaux dichroïques résultent donc des transitions électroniques des chromophores actifs contenus dans la molécule étudiée.

Les peptides peuvent ainsi donner des signaux de dichroïsme circulaire provenant soit du squelette peptidique formé d'une succession de chromophores amides (-C(=O)-N(H)-) placés

à proximité d'un centre asymétrique C^{α}, soit de certaines chaînes latérales aromatiques (Phe, Tyr, Trp).

Dans la région comprise entre 180 et 240 nm les signaux de dichroïsme circulaire des peptides résultent de la contribution des transitions électroniques π-π^* et n-π^* du chromophore peptidique.

Dans la région spectrale allant de 240 nm à 330 nm seules les chaînes latérales donnent des signaux dichroïques dus à des transitions L_a ou L_b. Leur influence peut également se manifester dans l'U.V. lointain mais les bandes situées aux faibles longueurs d'onde sont parfois difficiles à séparer des bandes dues aux transitions peptidiques.

Les transitions électroniques correspondant aux différents chromophores de la Pentagastrine sont représentées dans le Tableau 1.

II.3.9.2 - Mesure

L'absorption dichroïque $\Delta\varepsilon$ mesurée peut être représentée par une autre variable : l'ellipticité molaire $|\theta|_M$, ces deux grandeurs étant reliées par la formule :

$$|\theta|_M = \frac{3300 \times \Delta\varepsilon}{c \times l}$$

où

c représente la concentration du milieu étudié (mole/l)

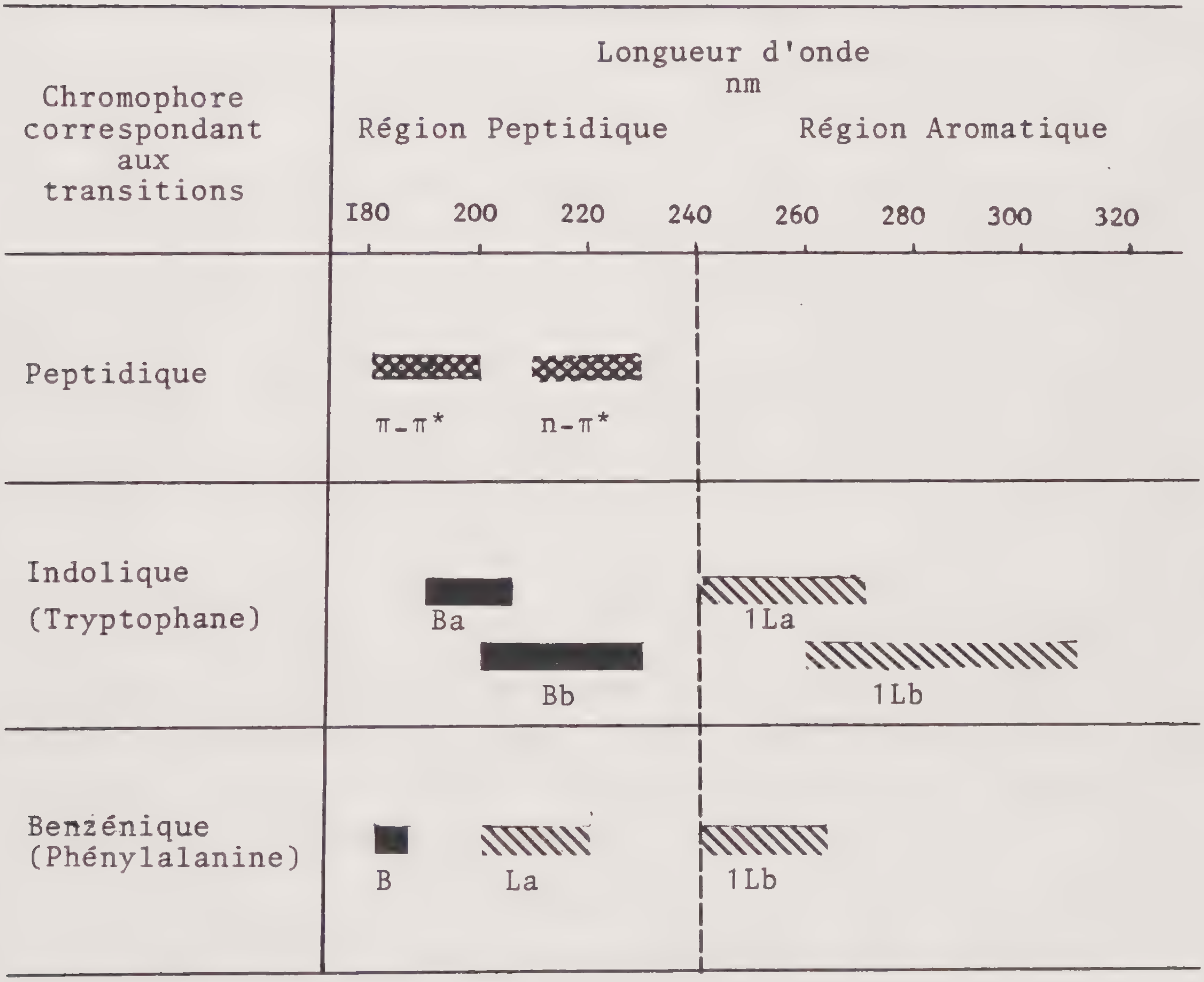
l le trajet optique (cm)

$|\theta|_M$ est alors exprimée en degré.cm^2/dmole

Les courbes de dichroïsme circulaire représentent la variation de cette ellipticité molaire en fonction de la longueur d'onde.

TABLEAU 1

Transitions électroniques correspondant aux différents chromophores de la pentagastrine



L'appareil de mesure utilisé est un dichrographe Mark V (Jobin Yvon, I.S.A. Paris) équipé d'un micro-ordinateur (Silex) et d'une table traçante (Ifélec IF 3802).

II.4 - MÉTHODES D'ÉTUDE BIOLOGIQUE ET RADIOIMMUNOLOGIQUE

II.4.1 - Mesures d'activité biologique

L'ensemble des expériences de mesure d'activité biologique a été réalisé dans le Laboratoire du Docteur M. Dubrasquet (unité INSERM U 10 du Professeur S. Bonfils) à l'Hôpital Bichat.

Parmi les nombreux phénomènes physiologiques liés à la libération de Gastrine ou à l'injection de ses analogues l'effet principal est exprimé par la secrétion d'acide chlorhydrique par les cellules pariétales de l'estomac. Une bonne estimation du pouvoir actif des dérivés gastriniques peut donc être donnée par la mesure de la quantité d'acide que leur injection in vivo provoque, pendant l'heure qui suit leur administration.

Cette secrétion a été étudiée sur un modèle de rat anesthésié à estomac perfusé / 32 / dont la secrétion acide est stimulée selon deux types d'administration : l'injection unique ou la perfusion. On peut alors, à partir de ces deux méthodes, établir des courbes de réponse permettant l'analyse de l'activité biologique du composé étudié.

L'interprétation des résultats obtenus sur un animal entier peut être plus complexe que dans des études in vitro sur un organe isolé ou sur des fractions tissulaires où l'on peut éviter l'intervention d'autres facteurs (nerveux par exemple) mais ce modèle permet l'administration successive de plusieurs doses d'un même composé, ou de plusieurs composés, à un même animal. On réduit ainsi les facteurs individuels liés à la différence de réaction de chaque rat.

II.4.1.1 - Préparation du modèle

La technique utilisée est celle décrite par Ghosh et Schild / 32 / et modifiée par Lai / 53 /.

Des rats mâles Wistar (de 300 ± 25 g) privés de nourriture solide depuis 18 heures mais ayant la possibilité de boire de l'eau à volonté sont anesthésiés à l'uréthane (1,25 g/kg) par voie intramusculaire.

Un cathéter de polyéthylène est introduit dans l'oesophage jusqu'au niveau du cardia et un deuxième cathéter recueille la secrétion de l'estomac au niveau du duodénum (figure 8).

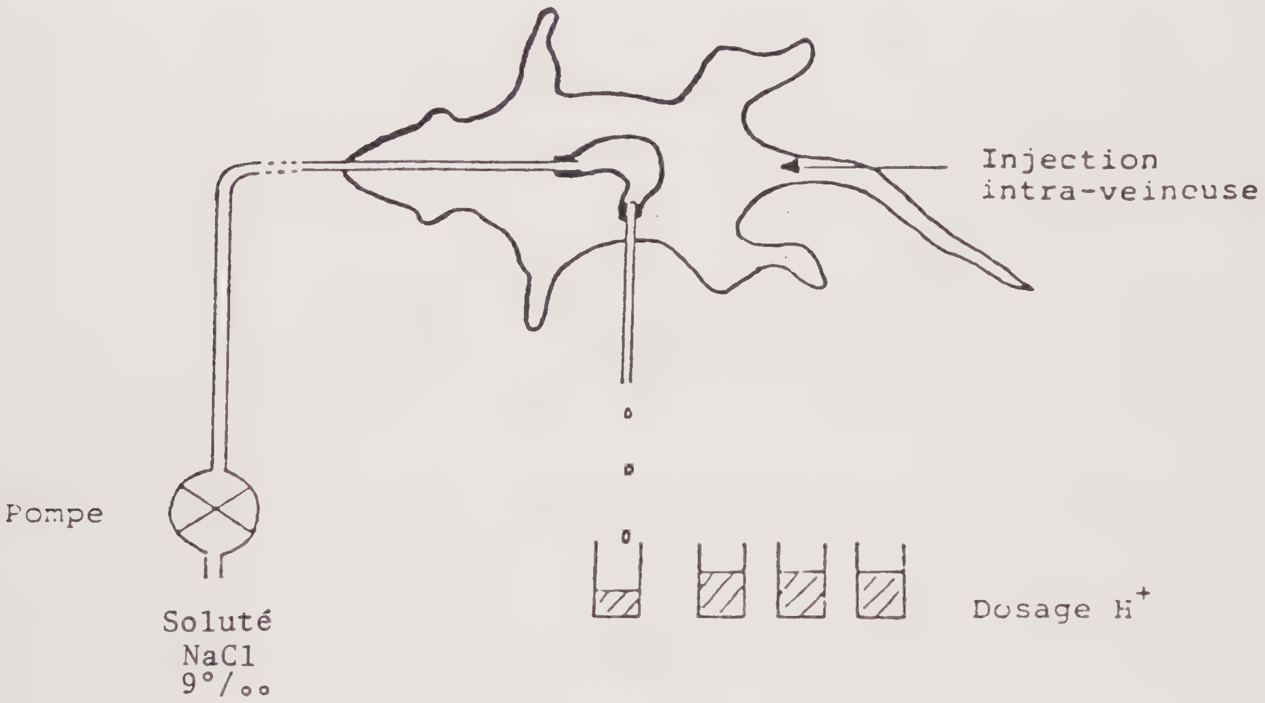


Figure 8 - Modèle du rat anesthésié à estomac perfusé (technique de Ghosh et Schild).

Après lavage de l'estomac une pompe péristaltique connectée au cathéter de l'oesophage permet une perfusion continue de soluté de chlorure de sodium à 0,9 % à un débit de 1 ml/mn.

La température des rats (34°C) est éventuellement maintenue à l'aide de lampes.

Après une période de stabilisation du système d'environ 1 heure 30 après l'intervention, le composé que l'on veut étudier est injecté par voie intraveineuse (veine du pénis) et la secrétion gastrique est collectée par fraction de 20 mn. L'intervalle entre les injections doit être au minimum de 90 minutes.

La secrétion acide (débit acide des 20 mn collectées) est mesurée par titration avec de la soude 0,01 N au virage de la phénolphtaléine.

II.4.1.2 - Courbes dose-réponse

La réponse biologique d'un organe cible sous l'effet d'une hormone est fonction de l'affinité de celle-ci pour son récepteur et de sa capacité une fois liée à déclencher les processus cellulaires.

Il y a proportionnalité d'une part, entre la dose de stimulant administrée et sa concentration au niveau du récepteur et d'autre part, entre l'amplitude de la réponse et le nombre de récepteurs activés.

Ainsi, puisque l'interaction hormone-récepteur répond à la loi d'action de masse

$$R + H \rightleftharpoons RH$$

où

R représente la concentration en sites récepteurs libres,

H la concentration hormonale,

RH la concentration en sites récepteurs occupés.

on peut, par analogie, appliquer cette loi aux relations dose-réponse / 60 /. On obtient alors à l'équilibre l'équation Michaelienne suivante :

$$R = R_{max} \frac{D}{K + D}$$

où

R est la réponse biologique (et R_{max} la réponse maximale),

D la dose d'agoniste au voisinage immédiat du récepteur,

K la dose produisant 50 % de la réponse maximale.

La représentation de R en fonction de D donne une hyperbole d'asymptote horizontale R_{max} (figure 9).

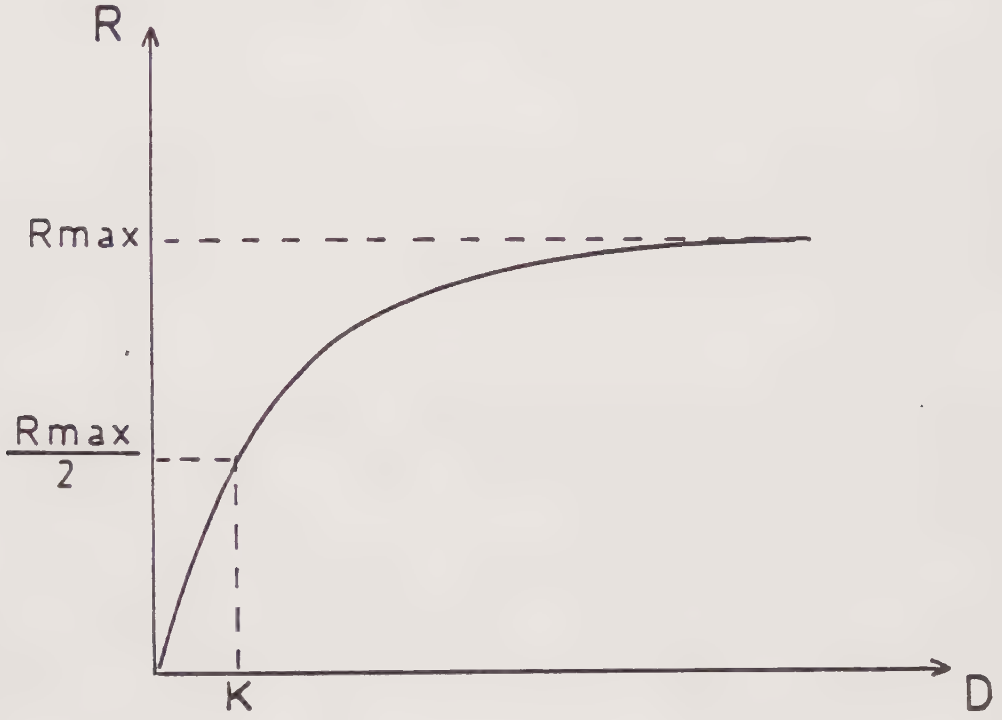
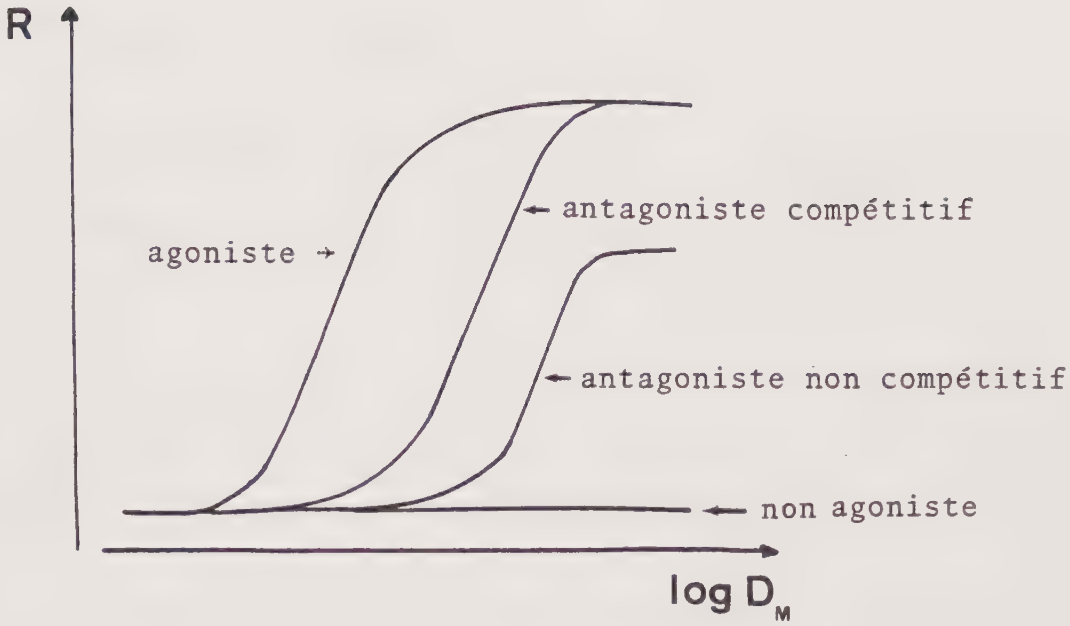


Figure 9 - Représentation de Michaelis-Menten des courbes dose-réponse.

La réponse biologique peut également être représentée en fonction du logarithme décimal de la dose d'agoniste injectée.

On obtient des courbes du type suivant :



Les réponses à différentes doses croissantes d'agoniste permettent ainsi d'obtenir des courbes dose-réponse atteignant un plateau de secrétion lorsque tous les sites récepteurs sont activés.

L'administration simultanée d'un agoniste et d'un antagoniste déplace les courbes dose-réponse vers la droite. On peut ainsi déterminer le caractère antagoniste d'un composé.

S'il y a récupération de la réponse maximale en présence de fortes doses d'agoniste, l'inhibition est de type compétitif.

De même, ces courbes peuvent révéler le pouvoir potentialisateur d'une substance puisque, administrée avec un agoniste de référence, elle déplacerait ces courbes vers la gauche.

Les réponses secrétoires peuvent être obtenues selon deux types de stimulation : l'injection unique ou la perfusion.

II.4.1.2.1 - Injection unique

L'injection unique d'un agoniste seul ou associé à un antagoniste à différentes doses permet une obtention rapide de la réponse secrétoire (maximale entre 20 et 40 mn après injection pour la pentagastrine et entre 40 et 60 mn pour l'histamine).

La secrétion basale du rat au repos est recueillie pendant 40 minutes puis, après l'injection de l'agoniste ou du mélange agoniste-antagoniste (dans 0,2 à 0,4 ml de sérum physiologique), la sécrétion est collectée pendant 40 minutes.

La secrétion des 40 minutes précédant l'injection suivante ne doit pas différer de plus de 10 % de la secrétion basale initiale.

La réponse secrétoire est calculée par la différence entre la secrétion des 40 minutes suivant l'injection et celle des 40 minutes la précédant.

La réponse à chaque dose de stimulant est donnée, en µmole H^+/40 mn, par la moyenne $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (ESM) des réponses obtenues sur un groupe d'animaux (environ 6 à 8 valeurs).

II.4.1.2.2 - Plateau de secrétion

L'administration d'un stimulant par perfusion permet d'obtenir, après stabilisation de la secrétion, un plateau de secrétion. L'intérêt de ce protocole est d'assurer une concentration constante du stimulant au niveau du récepteur.

A partir d'un plateau de secrétion on peut soit étudier l'effet agoniste du stimulant par perfusion d'une nouvelle dose, soit étudier l'inhibition de ce plateau par un antagoniste administré en injection unique ou perfusé tout en maintenant la perfusion du stimulant de référence.

La réponse correspondant au plateau de secrétion d'un stimulant est calculée par la différence entre la moyenne des deux réponses secrétoires consécutives de 20 mn les plus élevées et la moyenne de la secrétion basale. Elle est exprimée en µmole H^{+}/20 mn. Les différents plateaux de secrétion obtenus par des doses croissantes de stimulant permettent aussi de tracer des courbes dose-réponse.

Dans le cas de l'inhibition d'un plateau de secrétion par un antagoniste la valeur du plateau est donnée par la moyenne des secrétions des trois fractions consécutives stables précédant l'injection de l'antagoniste. Les variations de secrétion après administration de l'antagoniste sont exprimées en pourcentage de la valeur du plateau.

Une expression de l' "intensité-durée" de l'inhibition est donnée par l'aire d'inhibition. Elle est calculée par la surface délimitée par le niveau du plateau de secrétion et la courbe de la variation de la secrétion.

II.4.2 - Dosages radioimmunologiques

Ces dosages ont été réalisés dans le Laboratoire du Docteur J.P. Accary (Unité INSERM U 10 du Professeur S. Bonfils) à l'Hôpital Bichat.

Le principe de base du dosage radioimmunologique est le déplacement d'une hormone marquée liée à son anticorps spécifique par fixation compétitive de l'hormone analogue non marquée :

Ag*-Ac	+	Ag	⟶	Ag-Ac	+	Ag*
antigène marqué lié (B)		Antigène non marqué				Antigène marqué libre (F)

Ce déplacement peut être représenté par l'évolution du rapport B/F en fonction de la quantité d'antigène non marqué que l'on fait incuber.

- Méthode :

La méthode utilisée est celle décrite par Yalow et Berson / 89 / : une gamme de dilutions successives est préparée pour chaque échantillon que l'on veut doser, pour un même volume final de 500 µl de tampon véronal 0,02 M pH 8,4 (solution de diéthylmalonylurée sodée à 4,12 g/l H_2O ajustée à pH 8,4 par HCl 1N) contenant du plasma de lapin lyophilisé (1 ampoule Institut Pasteur pour 100 ml de tampon).

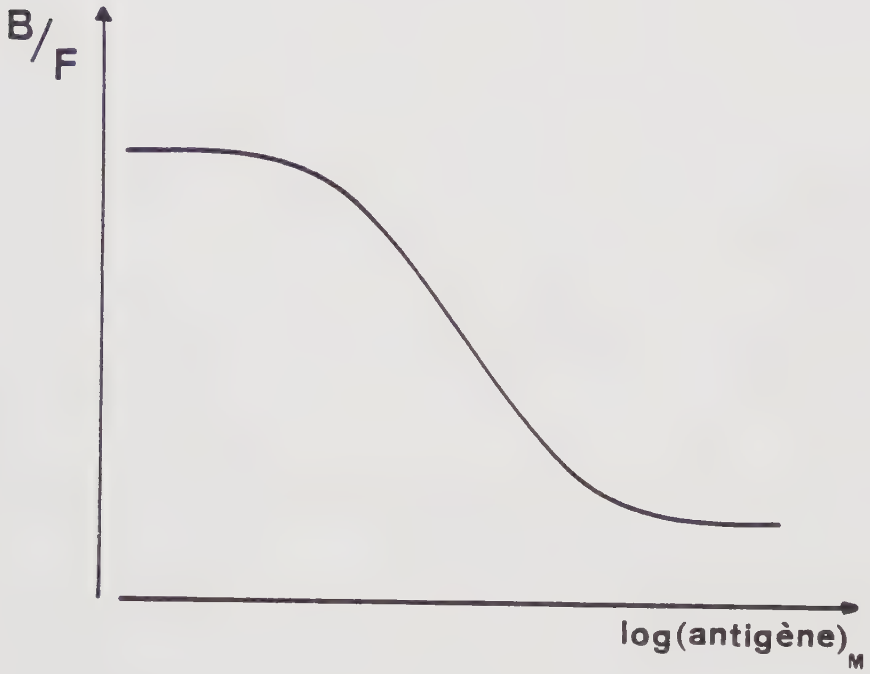
A chaque tube on ajoute 1,5 ml d'une solution contenant antisérum (dilution finale 1/67 000) et hormone marquée (2 500 cpm par tube).

L'hormone marquée utilisée au cours de nos dosages radioimmunologiques est de la Gastrine humaine (2-17) marquée à l'Iode-125 selon la méthode de Hunter et Greenwood et purifiée par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (amino-éthylcellulose AE 41-Whatman).

L'antisérum a été obtenu après immunisation de lapins de Nouvelle-Zélande par de la Gastrine humaine (2-17) couplée à la sérum albumine bovine pour la rendre immunogène. Il contient donc des anticorps spécifiques anti-G (2-17).

Après 48 heures d'incubation à 4°C on ajoute à chaque tube 100 µl de plasma humain et 200 µl d'une suspension de résine d'Amberlite IRP 58 M (100 mg/ml tampon véronal). Cette résine fixe l'hormone libre et après agitation au vortex et centrifugation (15 mn à 3 000 tours/mn) l'hormone liée (B) est recueillie dans le surnageant tandis que l'antigène libre (F) reste dans le culot.

Un comptage de la radioactivité ^{125}I incorporée dans les deux fractions permet donc de déterminer le rapport B/F pour chaque dose d'antigène incubé, ce qui permet de tracer des courbes du type suivant :



CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

RECHERCHE ET ETUDE D'ANTAGONISTES DE LA PENTAGASTRINE

III.1 - MODIFICATIONS DU TRYPTOPHANE

Le choix du tryptophane comme résidu pouvant conduire, par modification chimique, à l'obtention d'antagonistes de la Pentagastrine, s'est imposé dans la logique des résultats qui avaient été obtenus avec le premier dérivé de cette famille, la Pentagastrine NPS.

Nous avons tout d'abord poursuivi l'étude de cet antagoniste puis nous avons synthétisé et étudié un deuxième dérivé de la Pentagastrine à tryptophane modifié : la Phénylsulfényl Pentagastrine.

III.1.1 - O-nitrophénylsulfényl-Pentagastrine (PGNPS)

Après quelques rappels des résultats déjà obtenus sur ce dérivé, nous présenterons les nouvelles données concernant cet antagoniste.

III.1.1.1 - Rappels

III.1.1.1.1. - Synthèse

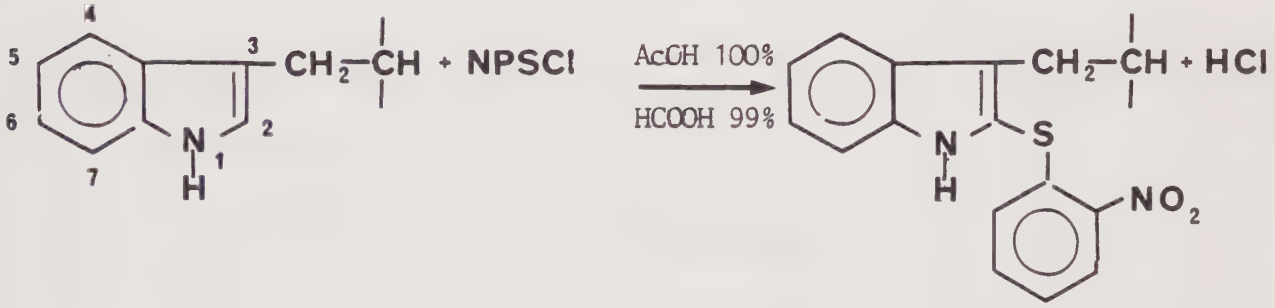
Ce dérivé est obtenu par réaction de la Pentagastrine avec le chlorure d'o-nitrophénylsulfényle (NPSCl) / 94, 44 /.

Ce réactif peut donner lieu, en présence de peptide ou de protéine, à la formation de différents dérivés selon les conditions expérimentales.

En milieu basique (pH 8-9) il réagit avec les groupements aminés libres / 92, 28 / et sert à protéger ces fonctions, en synthèse peptidique, par formation d'une liaison sulfénamide.

En milieu acide, acétique glacial ou formique, il réagit spécifiquement avec les groupements thiols des cystéines et le noyau indolique du tryptophane / 78, 79, 29, 13 /.

Dans le cas de la Pentagastrine, seul le Tryptophane peut réagir et le NPS se fixe en C_2 du noyau indolique selon le schéma de réaction suivant :



Cette réaction est stoechiométrique / 79 / et suit une cinétique globale d'ordre 2 / 68 /.

La Pentagastrine NPS a donc été synthétisée selon ce procédé, à température ambiante et à l'abri de la lumière, sous agitation magnétique, par mélange équimolaire de Pentagastrine et de NPSCl dans l'acide acétique glacial.

L'avancement de la réaction a été suivi par mesure d'absorption optique à λ = 280 nm ($\Sigma_{280\ nm}$ (PG) = 5 800 cm^{-1} $mole^{-1}$.l ;

$\Sigma_{280\ nm}$ (PGNPS) = 17 300 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$) ou λ = 360 nm ($\Sigma_{360\ nm}$ (PGNPS) = 4 200 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$), et par chromatographie sur couche mince (solvant : BAW/EtoAc 15/85 ou 30/70).

La vitesse de la réaction est bien sûr fonction de la concentration du peptide : à $2,5.10^{-4}$ M/L la réaction nécessite 10 heures, à 10^{-2} M/L elle est terminée en moins d'une heure.

III.1.1.1.2 - Purification

La PGNPS a été purifiée par chromatographie liquide sur un support de Silice 60 en utilisant une colonne de verre et en éluant le mélange réactionnel par un gradient d'EtoAc (acétate d'éthyle) et de BAW (n-Butanol : Acide acétique : eau/75:10:24).

La PGNPS s'élue vers 15 % BAW.

Le contrôle de la pureté du dérivé a été réalisé par chromatographie sur couche mince dans plusieurs systèmes et par spectrométrie.

III.1.1.1.3 - Activité biologique

L'activité biologique de la Pentagastrine NPS a été étudiée, d'une part par injection unique de ce composé et d'autre part par perfusion au cours d'une stimulation constante de secrétion par la Pentagastrine / 22 /.

Les réponses obtenues par l'injection de PGNPS seule à différentes doses montrent que la PGNPS ne présente aucune activité agoniste, même à forte dose, alors que la réponse maximale à la Pentagastrine est atteinte à 5,2 nmoles/kg (figure 10).

Par contre, administrée simultanément à la PG, la PGNPS déplace la courbe dose-réponse de l'agoniste. Le parallé-

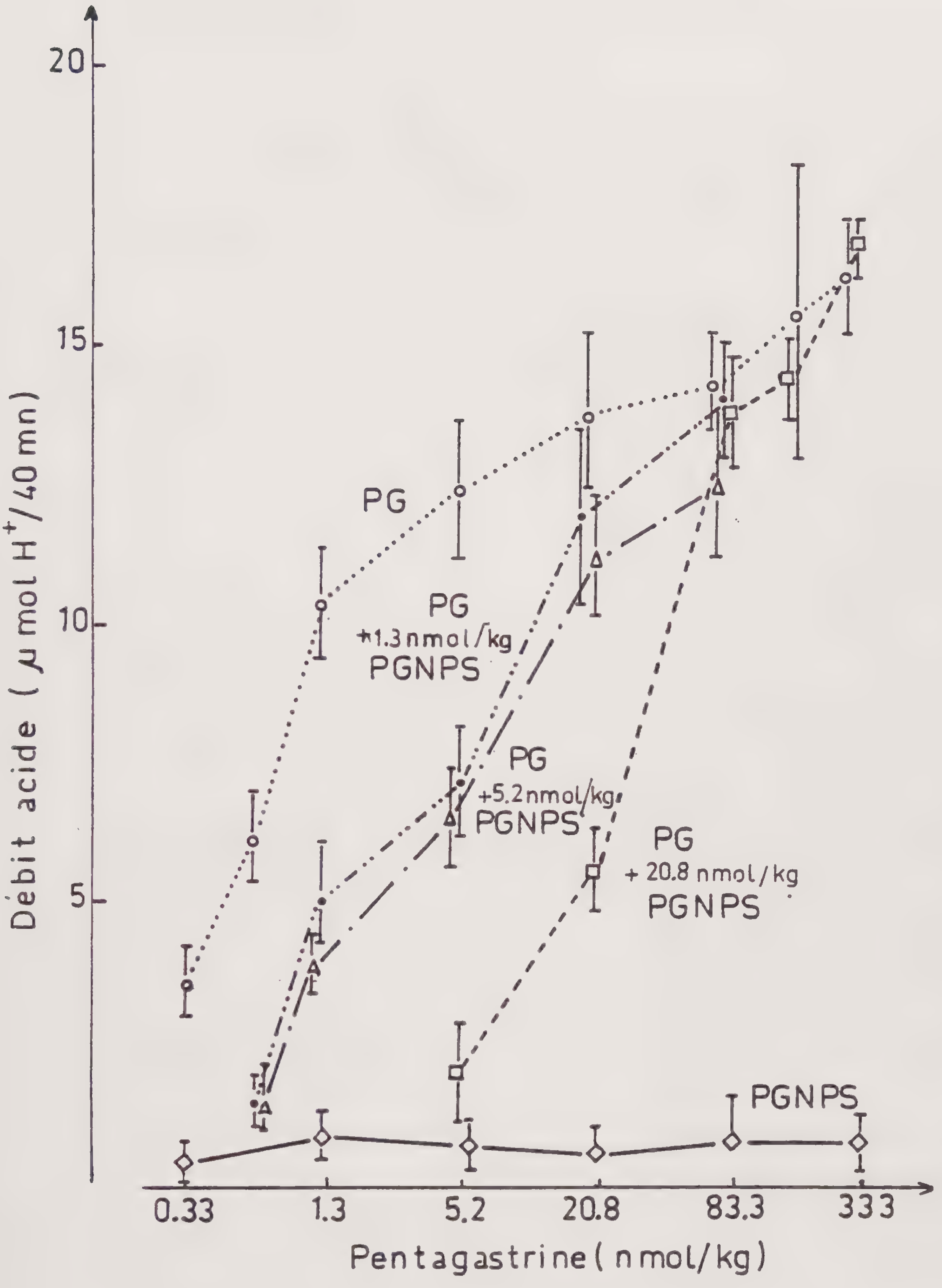
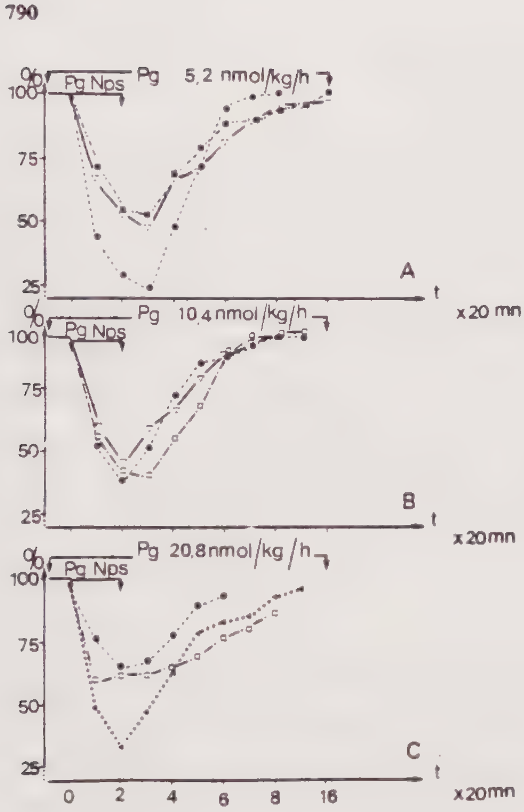


Figure 10 - Courbes dose-réponse de PG seule (o), PGNPS seule (◇) PG + PGNPS 1,3 (●), 5,2 (Δ) et 20,8 (□) nmol/kg.

lisme de la partie linéaire des courbes obtenues, et la récupération de la réponse maximale en présence de fortes doses de PG démontrent le caractère compétitif de l'inhibition provoquée par la Pentagastrine NPS.

Le pouvoir antagoniste de ce dérivé a été vérifié par perfusion de PGNPS au cours d'une stimulation de secrétion aci de constante stimulée par la Pentagastrine (figure 11).



<u>Figure 11</u> - Variation (en %) de la secrétion stimulée par la pentagastrine après perfusion de PGNPS pendant 40 min.

A. Pentagastrine (PG) 5,2 nmol/kg/h (réponse acide maximale : 35,7 ± 1 µmol/20 min) : inhibition par 5,2 (■ ·–·–), 10,4 (▽——), 20,8 nmol/kg/h de PGNPS (●----).

B. Pentagastrine (PG) 10,4 nmol/kg/h (réponse acide maximale : 41,5 ± 2 µmol/20 min) : inhibition par 10,4 (▽——), 20,8 (●----), 41,60 (□·—·) nmol/kg/h de PGNPS.

C. Pentagastrine (PG) 20,8 nmol/kg/h (réponse acide maximale : 42,5 ± 1,5 µmol/20 min) : inhibition par 20,8 (●----), 41,60 (□–·–), 332,8 (▼····) nmol/kg/h de PGNPS.

(figure empruntée à M. DUBRASQUET et collaborateurs / 22 /).

Quel que soit le niveau du plateau de secrétion, la perfusion de PGNPS entraîne une inhibition de la secrétion plus

longue que le temps de perfusion et proportionnelle au rapport des doses d'inhibiteur et d'agoniste.

Cette inhibition compétitive de secrétion obtenue par voie intraveineuse, a été également observée lorsque le dérivé Pentagastrine NPS est administré par voie intraduodénale ou intragastrique. C'est une observation importante en raison de la nature peptidique du composé. En règle général, en effet, les peptides sont scindés par les enzymes du tube digestif. La persistence d'une activité biologique de la Pentagastrine NPS suggère soit une résistance à l'hydrolyse, soit la rémanence de l'activité d'un de ses fragments.

III.1.1.1.4 - Résistance enzymatique

Les remarques précédentes ont entraîné l'étude / 72 / de l'hydrolyse enzymatique de la Pentagastrine et de son dérivé NPS par la pepsine,enzyme présente en quantité importante dans l'estomac. On constate que le dérivé NPS est hydrolysé à une vitesse environ 10 fois plus lente que la Pentagastrine, la pepsine coupant ces peptides au niveau de la liaison -Trp-Met-. Ainsi le groupement NPS fixé sur le Tryptophane protège le peptide de la dégradation enzymatique par la pepsine, en empêchant, probablement par son encombrement, l'accès de l'enzyme à la liaison sensible.

Parmi les enzymes du duodénum (trypsine, α-chymotrypsine, carboxy-et amino-peptidase) seule l'α-chymotrypsine a une action sur la PGNPS. Elle hydrolyse l'amide C-terminal de la PG et de la PGNPS de façon identique. Par contre, le groupement NPS protège le peptide d'autres dégradations, par cette enzyme, observées sur la PG. Mais si la PG déamidée perd son pouvoir stimulateur, la PGNPS déamidée conserve son pouvoir antagoniste / 69 / ce qui suggère d'ailleurs que l'amide C-terminal de la Pentagastrine est impliqué dans le déclenchement de l'activité biologique sans être un point d'ancrage essentiel du peptide au site récepteur.

Que la PGNPS soit absorbée au niveau de l'estomac ou du duodénum, son pouvoir inhibiteur est donc conservé dans les deux cas. Ces résultats contribuent à comprendre le maintien des propriétés antagonistes de la Pentagastrine NPS administrée par voie orale.

III.1.1.2 - Développement

L'ensemble des recherches pharmacologiques et toxicologiques nécessitées par un développement industriel de la PGNPS requiert des quantités importantes de ce dérivé. Nous avons alors dû adapter les techniques de synthèse et de purification à cet effet.

III.1.1.2.1 - Synthèse

A forte concentration de peptide sa réaction avec le chlorure de nitrophénylsulfényle est rapide et est théoriquement stoechiométrique mais en pratique on ne peut pas obtenir un rendement de 100 % si l'on utilise un mélange équimolaire de peptide et de NPSCl.

En effet, en présence d'humidité de l'air ou de lumière le NPSCl peut subir diverses transformations conduisant à la formation de dérivés sulféniques (par l'humidité), sulfiniques sulfones ou sulfoniques (par l'oxygène de l'air) ou disulfures (par les rayonnements lumineux $h\nu$).

Mais si un excès de NPSCl est nécessaire pour augmenter le rendement de la réaction, il faut remarquer qu'un trop grand excès de ce réactif accélère la coupure du groupement Boc- protégeant l'extrémité N-terminale de la Pentagastrine. Cette déprotection est en effet due à la présence de HCl formé d'une part au cours de la réaction et d'autre part par hydrolyse du NPSCl. L'action de HCl est d'autant plus importante que le temps de réaction est plus long. Il se forme alors le peptide déprotégé H-βAla-Trp(NPS)-Met-Asp-PheNH$_2$ qui a été identifié par analyse d'acides aminés, par chromatographie sur couche mince et par électrophorèse.

Ses caractéristiques d'absorption UV et visible sont identiques à celle du N_α-Boc-peptide mais son pouvoir inhibiteur est plus faible. Il faut donc éviter sa formation qui se fait au détriment de l'antagoniste désiré.

Nous préconisons, dans ce but, de conduire la réaction (PG + NPSCl) à l'obscurité, sous atmosphère d'azote, en utilisant un rapport NPSCl/PG d'environ 1,2 et en un temps de réaction le plus court possible.

Pour des concentrations supérieures à 10 mg/mL d'acide acétique la Pentagastrine est insoluble et reste en suspension. La fin de la réaction peut alors être observée lorsque l'on obtient une solution jaune limpide, le dérivé étant plus soluble que le peptide initial.

III.1.1.2.2 - Purification

La purification par chromatographie liquide classique (sous pression atmosphérique) est longue et nécessite des quantités importantes de solvant. Nous avons voulu améliorer cette étape en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui permet une élution rapide, en utilisant moins de solvant, et donnant une meilleure résolution.

Nous avons trouvé plusieurs systèmes chromatographiques HPLC qui nous ont permis d'isoler parfaitement la Boc-PGNPS des autres constituants du mélange réactionnel (l'excès de NPSCl et de ses produits de décomposition, le produit déprotégé H-PGNPS, la Boc-PG n'ayant pas réagi) (Tableau 2).

Cependant l'activité biologique de la Boc-PGNPS purifiée par cette méthode ne présente plus que 10 à 30 % du pouvoir inhibiteur obtenu lorsque le dérivé était purifié par chromatographie classique dans une colonne de verre.

La méthode de mesure de l'activité biologique étant la même dans les deux cas, deux raisons pouvaient conduire à cette différence de résultats :

TABLEAU 2

Produit		$(o\text{-}NO_2)C_6H_5\text{-}S\text{-}Cl$	Boc-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2	Boc-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 (NPS)	H-βAla-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 (NPS)
Absorbance Molaire (/CH_3COOH)		ε_{385nM} = 3200		ε_{360} = 4200	ε_{360} = 4200
		ε_{284nM} = 4400	ε_{280nM} = 5800	ε_{280} = 17300	ε_{280} = 17300
a) Détection en CCM	U	+	+	+	+
	N	-	-	-	+
	E	-	+	-	-
	C	+	+	+	+
b) RF	I	0.97	0.24	0.47	0
	II	0.95	0.68	0.88	0.05
	III	0.98	0.85	0.92	0.46
	IV	0.98	0.53	0.68	0.14
	V	0.80	0.85	0.88	0.78
	VI	0.95	0.79	0.80	0.79
	VII	0.96	0.76	0.89	0.12
	VIII	0.48	0.71	0.66	0.53
c) TR	1	2.4	7.4	3.6	non élué
	2	2.4	4.8	3.1	non élué
	3	19.0	12.7	14.7	11.0
	4	19.6	15.7	17.4	13.9

a) La détection en chromatographie sur couche mince (CCM) a été faite par examination en lumière UV (U), ou en utilisant les réactifs :(N) ninhydrine, (E) Ehrlich, (C) Cl_2-TMD

b) Valeur des R_F des CCM sur plaque 20 x 20 cm de silice (Merck, art.5715) utilisant les systèmes de solvants I à VII :
I : BAW/$EtOA_c$ (n Butanol : acide acétique : eau : 75 : 10 : 24)/(Ethyl acétate) (15/85), II BAW/EtOAc (30/70)
III : BAW, IV : $ETOA_c$/Pyridine/Eau/Acide acétique (60/20/11/6) ; V : Méthanol/Eau (70/30) ; VI : Chloroform/Méthanol/ acide acétique (70/20/5), VII : Acétonitrile /H_2O (70/30). Plaque RP 18 (Merck n°13724) , VIII : Acétonitrile /H_2O (70/30).

c) TR = temps de rétention (min), débit 1,2 ml/min, colonnes 0,3 cm x 25 cm. Support Si 60, 5 µ pour les systèmes 1 (BAW/$EtOA_c$: 10/90), et 2 : (BAW/$EtOA_c$: 15/85) ; support C18/ODS II, 10 µ pour les systèmes 3 (gradient de 20 % à 80 % ACN dans TEAP 0,1 M pH 3,5 en 20 mn) et 4 (gradient de 10% à 90% ACN dans $AcNH_4$ 0,01 M pH 4,7 en 20 mn)

- soit la Boc-PGNPS isolée par la première méthode n'était pas suffisamment pure et l'inhibition observée devait être rapportée à un composé contaminant.
- soit la deuxième méthode de purification introduit des modifications responsables de la perte du pouvoir antagoniste du dérivé isolé.

Pour répondre à ces questions nous avons contrôlé la pureté de la Boc-PGNPS éluée dans une colonne de verre (première méthode) par HPLC analytique dans quatre systèmes chromatographiques différents et par chromatographie sur couche mince dans huit systèmes différents (Tableau 2).

L'obtention d'un pic unique en HPLC analytique et d'une seule tache en CCM dans tous les systèmes étudiés nous a permis d'écarter la première solution, la pureté du produit ne pouvant plus être mise en doute.

Par contre, l'explication pourrait effectivement venir de la deuxième méthode de purification employée. En effet, la chromatographie HPLC nécessite l'utilisation de colonnes en acier et celles-ci relarguent souvent des traces d'ions métalliques. Or le dérivé o-nitrophénylsulfényl-PG contient du soufre et cet élément est bien connu pour sa capacité à former, grâce à ses électrons libres, des complexes plus ou moins forts avec les cations, notamment avec les ions métalliques bivalents / 33 /.

Dans le cas présent il est possible qu'au cours de la chromatographie sous haute pression des traces d'ions métalliques soient entraînées par la PGNPS, la complexation avec les ions pouvant être favorisée par la présence simultanée de deux atomes de S (Méthionine et NPS) au sein de la molécule. La démonstration directe d'une telle éventualité n'a cependant pas pu être apportée, les caractéristiques spectrales et chromatographiques dans les conditions employées ne montrant pas de différences significatives.

Toutefois, en utilisant de nouveau des colonnes de verre pour la purification de nouveaux stocks de Boc-PGNPS, on isole un composé qui présente les propriétés antagonistes précédemment décrites. Ces résultats sont reproductibles après 3 mois 1/2 de conservation du dérivé à 4°C puisque l'on obtient alors, par injections simultanées de 5,2 nmol/kg de PGNPS et 0.33, 1.3 ou 5.2 nmol/kg de PG, les réponses secrétoires suivantes ($\overline{X}$: moyenne en µmol H^+/40 mn sur 6 animaux).

PGNPS	5,2 nmol/kg			0		
PG	0,33	1,3	5,2	0,33	1,3	5,2
$\overline{X}$	1,5	3,2	4,6	3,6	10,5	12,6
± ESM	± 1,0	± 2,5	± 4,5	± 0,7	± 1,0	± 1,3

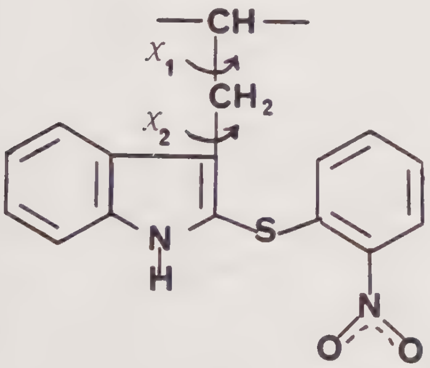
III.1.1.2.3 - Etude conformationnelle par spectroscopie

Le pouvoir antagoniste de la PGNPS suggère que ce dérivé conserve la structure compacte de la Pentagastrine pour pouvoir entrer en compétion avec elle au niveau de son récepteur. Ceci peut être vérifié par dichroïsme circulaire mais cependant l'étude comparative de la Pentagastrine et de son dérivé nitrophénylthioéther doit tenir compte, non seulement de la présence dans ce dernier d'un chromophore supplémentaire, mais encore des délocalisations électroniques résultant de l'influence mutuelle du groupe nitrophénylsulfényle et du noyau indole. Celle-ci est établie par comparaison des spectres d'absorption, dans un même solvant, l'acide acétique, de la Pentagastrine (ε_{280} = 5 800 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$) de la Pentagastrine NPS (ε_{280} = 17 300 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$; ε_{360} = 4 200 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$), du réactif NPSCl (ε_{284} = 4 400 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$; ε_{385} = 3 200 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$) et du dérivé modèle, N-acétyltryptophaneamide nitrophénylthioéther (Nac-Trp(NPS)-NH_2) (ε_{280} : 17 300 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$; ε_{360} = 4 200 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$).

La similitude des spectres d'absorption du dérivé modèle NAc-Trp(NPS)-NH_2 et de la Pentagastrine-NPS permet une comparaison de leurs spectres de dichroïsme circulaire (DC) reportés sur la figure 12 .

Dans la région des longueurs d'onde supérieures à 300 nm la PGNPS présente deux bandes positives intenses centrées vers 320 nm et 358 nm alors que pour le dérivé modèle des bandes de très faible intensité sont à peine visibles entre 310 et 370 nm. Le même phénomène est également observé dans la région aromatique (240-300 nm) où la PGNPS présente une bande centrée vers 278 nm beaucoup plus intense que celle du dérivé modèle .

Les bandes DC vers 278 nm et 358 nm provenant principalement de l'indole et du groupe S-C_6H_4-NO_2 respctivement , leur intensité importante reflète l'asymétrie qui témoigne en particulier de la rigidité du chromophore indolyl-NPS au sein du pentapeptide en contraste avec la grande liberté de rotation autour des angles de torsion χ_1 et χ_2 de ce chromophore dans le dérivé modèle .



Dans l'UV lointain (λ<250 nm) les spectres DC résultent de la superposition des contributions des chromophores aromatiques et peptidiques . Néanmoins on peut observer que l'amplitude des bandes DC du dérivé PGNPS est bien plus importante que celle du dérivé modèle . En particulier la présence des 2 bandes centrées vers 218 nm et 230 nm , de sens opposé et d'amplitude similaire (probablement deux bandes excitoniques) suggère l'existence d'interactions entre les noyaux aromatiques,proches les uns des autres et figés dans des positions privilégiées .

Ainsi , la présence du groupe NPS ne détruit pas la structure repliée et compacte de la Pentagastrine /1/ , et sem-

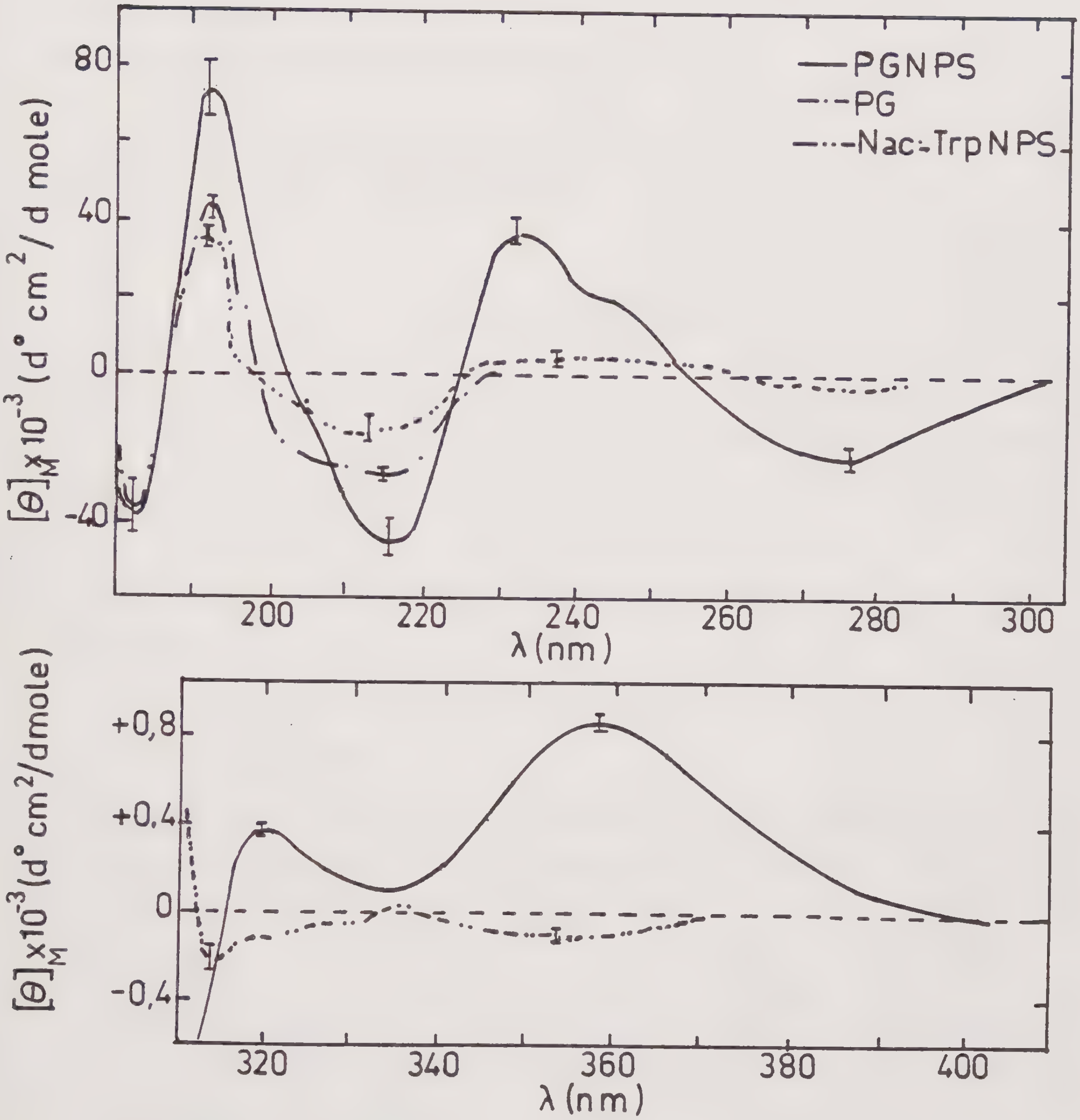


Figure 12 - Spectres de Dichroïsme Circulaire de PGNPS (—), PG (— . —) et Nac-TrpNPS (– ·· –) dans le trifluoroéthanol.

ble même la rendre encore plus rigide , sans doute grâce à la contribution supplémentaire du groupement NPS à la stabilisation de la région hydrophobe .

Ces observations peuvent être vérifiées en construisant le modèle moléculaire de la PGNPS .

III.1.1.2.4 - Modèle moléculaire

Le modèle moléculaire de la PG fondé sur les calculs d'optimisation d'énergie, permet la fixation d'un groupement NPS en C_2 du noyau indole du Tryptophane sans modification de la structure préexistante (figure 13).

On constate par surcroît que le groupement NPS ainsi fixé :

- d'une part, par sa nature, contribue à accroître la région hydrophobe du peptide ;

- d'autre part, par son encombrement, peut masquer plusieurs groupements du peptide, notamment le groupement imino (NH-) du noyau indole. Cette remarque peut être rapprochée de celle de Morley qui voit dans ce groupement imino un déterminant important dans le déclenchement de la réponse biologique au niveau du récepteur. De plus, la capacité de la Pentagastrine NPS à se fixer au récepteur démontre que le groupe imino du Tryptophane necontribue pas de façon essentielle à la liaison spécifique de l'hormone

III.1.2 - Phénylsulfénylpentagastrine (PGPS)

La détermination des paramètres responsables de l'antagonisme induit par le groupement NPS nécessite la synthèse et l'étude d'autres composés dérivant de la PGNPS. En effet, son pouvoir inhibiteur peut être dû soit à la taille du groupement NPS, soit à son aromaticité, soit encore, plus spécifiquement

Figure 13 - Modèles moléculaires de la Pentagastrine (en haut) et de la Pentagastrine NPS (en bas).

à l'atome de soufre ou au groupe NO_2 qui pourrait former des liaisons H avec un site du récepteur impliqué dans le déclenchement de l'activité biologique. Pour élucider ce problème nous avons tout d'abord étudié le rôle du groupe NO_2. Pour cela nous avons synthétisé un dérivé ne contenant pas ce groupe : la Phénylsulfényl-Pentagastrine ou PGPS. Le groupement PS confère au peptide un encombrement et une spécificité peu différents de ceux du NPS et l'absence du groupe NO_2 procure par ailleurs une qualité à ce nouveau dérivé : en effet, le groupement NPS peut, par réduction partielle, conduire à des groupements nitroso qui sont particulièrement réactifs et potentiellement toxiques.

La phénylsulfényl-Pentagastrine est obtenue par action, sur la Pentagastrine, de phénylthiochlorure, réactif qui, n'étant pas commercialisé, doit être au préalable synthétisé.

III.1.2.1 - Préparation du Phénylthiochlorure PSCl

Deux méthodes de préparation de ce réactif ont été suivies :

III.1.2.1.1 - Méthode de Lecher / 55 / : chloruration du thiophénol

Selon ce procédé, le phénylthiochlorure est obtenu par action de chlore gazeux sur du thiophénol :

150 ml de tétrachlorure de carbone CCl_4 sont refroidis à 0°C par un mélange glace-NaCl. On y fait barboter lentement et sous agitation un courant de chlore, préalablement séché dans l'acide sulfurique concentré jusqu'à saturation. On ajoute alors goutte à goutte une solution de thiophénol (6 g dans

50 ml de CCl_4). La réaction se poursuit sous agitation pendant 1 heure à 20°C; lorsque la solution réactive prend une coloration orangée, le chlore en excès est piégé dans une solution de soude 2N et tiré à la trompe à eau. Puis on distille successivement le CCl_4 et le thiophénol qui n'a pas réagi. Leurs températures d'ébullition sous pression atmosphérique sont respectivement de 77°C et 168,7°C.

Le phénylthiochlorure est ensuite purifié par distillation sous vide. Il se présente sous l'aspect d'un liquide rouge intense, fumant à l'air.

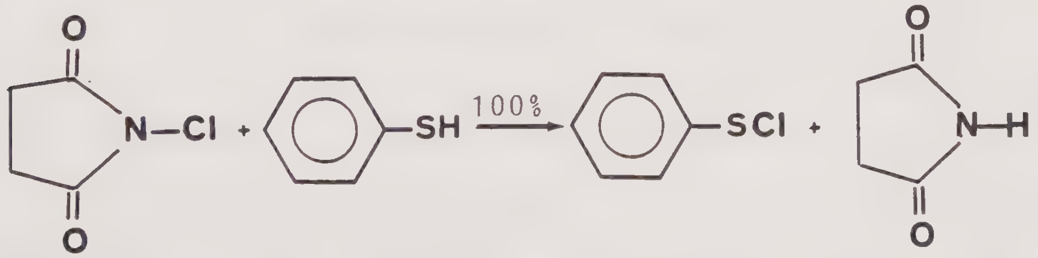
Sa température d'ébullition, sous 3 mm de mercure, est de 58°C.

Ce produit, très sensible à l'humidité de l'air, est conservé sous azote dans des ampoules scellées. Cependant, malgré ces précautions, on observe après quelques semaines, la détérioration du produit.

Deux autres méthodes d'obtention du PSCl ont alors été suivies.

III.1.2.1.2 - Méthodes de Wieland / 87 / et de Hopkins / 43 / : réaction du thiophénol avec du N-chlorosuccinimide

Ces auteurs réalisent la chloruration des thiols (-SH) par action du N-chlorosuccinimide.



Leurs modes opératoires ne diffèrent principalement que par le solvant utilisé (chloroforme ou dichlorométhane).

En suivant la méthode de Wieland, une suspension de N-chlorosuccinimide (27 mg, 208,7 µmoles dans 540 µl de chloroforme) est refroidie à -15°C par un mélange glace-NaCl. Sous agitation et également à -15°C une solution de thiophénol (174 µmoles) dans 870 µl de chloroforme-tétrahydrofurane (1,5/1 v/v) est alors ajoutée goutte à goutte en 30 mn sous un courant d'azote. Après une heure à froid, la réaction est poursuivie à température ambiante pendant 30 minutes. On obtient une solution jaune de PSCl dans le chloroforme dont la pureté est contrôlée par chromatographie sur couche mince après séparation, par filtration, du succinimide co-produit.

Nous avons également essayé la méthode de Hopkins et Fuchs, qui préconisent l'utilisation du chlorure de méthylène comme milieu réactionnel. Suivant leur méthode nous avons additionné 100 µmoles de thiophénol à une suspension de N-chlorosuccinimide (114 µmoles dans 100 µl de chlorure de méthylène). Cette réaction a été effectuée à -30°C pendant 1 heure. Comme précédemment la coloration jaune de la solution de PSCl apparaît rapidement (en quelques minutes) et la pureté du réactif obtenu a également été contrôlée par chromatographie sur couche mince : sur plaque de silice HP-KF (Whatman), dans un mélange d'élution Ethylacétate/B.A.W. (85/15) nous avons obtenu R_f (PSCl) = 0,74.

Le chlorure de phénylsulfényle ainsi synthétisé est utilisé immédiatement après préparation pour réagir avec le Tryptophane de la Pentagastrine.

III.1.2.2 - Caractérisation du PSCl

III.1.2.2.1 - Spectre infra-rouge

Le spectre infra-rouge du PSCl distillé, réalisé entre deux plaques de NaCl ou de KBr (d'épaisseur e = 0,051 mm), comparé à celui du thiophénol de départ, a permis également de vérifier la pureté du réactif obtenu (figure 14). Les bandes I.R.

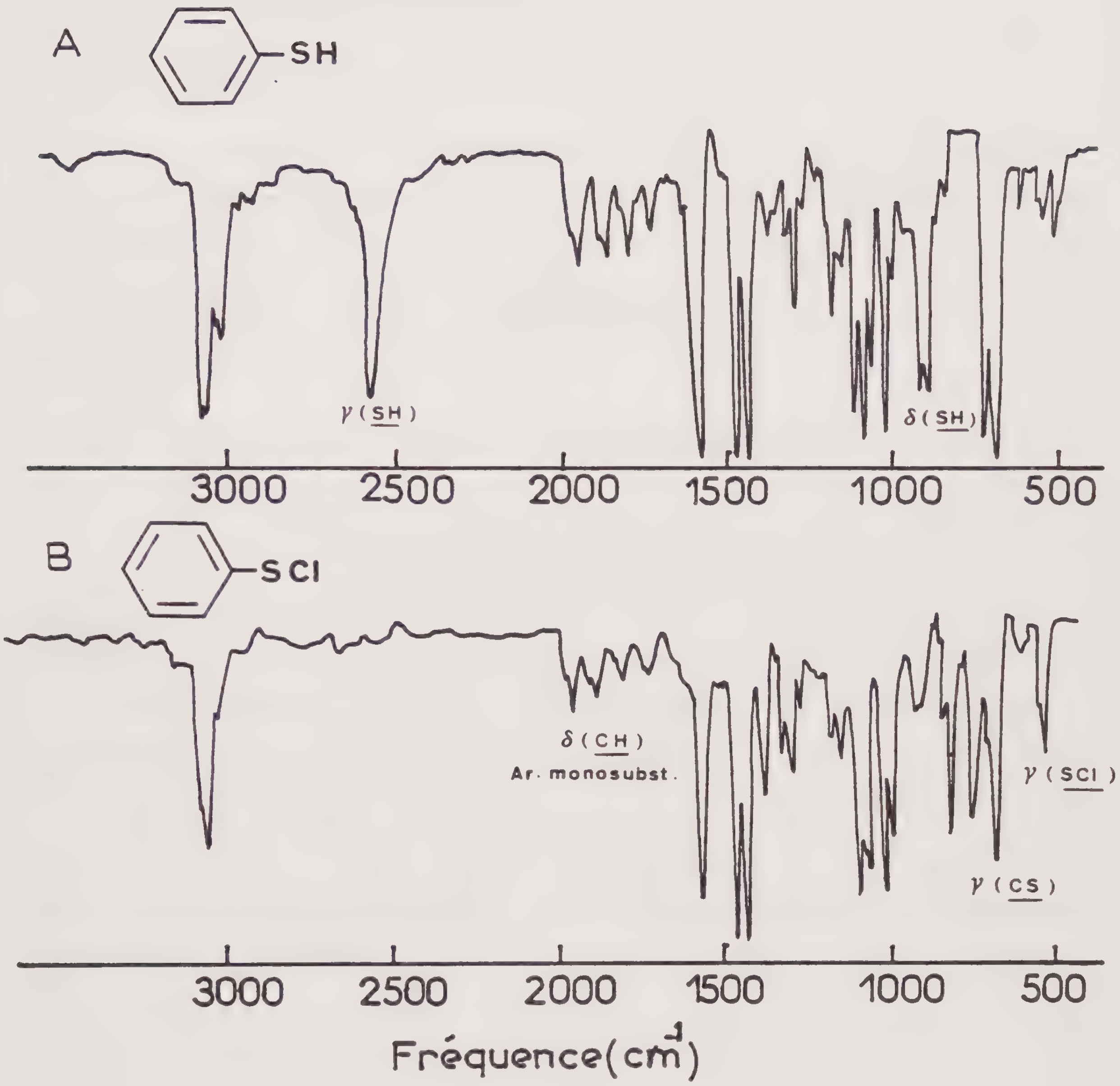


Figure 14 - Spectres d'absorption infrarouge du thiophénol (A) et du phénylthiochlorure (B).

caractéristiques du thiophénol (ν_{SH} à 2 570 cm^{-1} et δ_{SH} à 900 cm^{-1}) ont disparu après chloruration du thiophénol ; par contre, apparaît la bande ν_{SCl} (500 cm^{-1}).

Le spectre infra-rouge du PSCl nous indique également que le cycle aromatique du produit obtenu est bien monosubstitué (4 bandes δ_{CH} caractéristiques entre 2 000 cm^{-1} et 1 700 cm^{-1}, et ν_{C-C} à 1 440 cm^{-1}, 1 470 cm^{-1} et 1 580 cm^{-1}). L'halogénation s'est donc bien portée uniquement sur le SH et non sur le cycle aromatique.

III.1.2.2.2 - Spectre de RMN du proton

Les spectres de RMN (H) du thiophénol et du phénylthiochlorure ont été réalisés dans du CCl_4 en présence de tétraméthylsilane (TMS) comme référence. Le spectre du thiophénol pur (figure 15) montre deux pics de résonance respectivement à 3,4 ppm (résonance du proton du groupement thiol) et à 7 ppm (résonance des 5 protons du noyau aromatique), dont l'intégration donne bien un rapport de 1 à 5 concordant avec la structure du produit. Dans le spectre du phénylthiochlorure distillé, le pic de résonance à 3,4 ppm disparaît totalement et seul subsiste le pic de la région aromatique, ce qui confirme bien la pureté du réactif synthétisé.

III.1.2.2.3 - Absorption U.V. et visible

Le spectre d'absorption du phénylthiochlorure en solution dans du CCl_4 présente un maximum caractéristique à 389 nm dans le visible et 2 pics dans l'U.V. à 288 et 280 nm.

Les coefficients d'extinction molaire à ces longueurs d'onde ont été calculés à :

$$\varepsilon_{389\ nm}\ (PSCl) = 425\ cm^{-1}.mole^{-1}.l$$
$$\varepsilon_{288\ nm} = 1\ 700\ cm^{-1}.mole^{-1}.l$$
$$\varepsilon_{280\ nm} = 1\ 100\ cm^{-1}.mole^{-1}.l$$

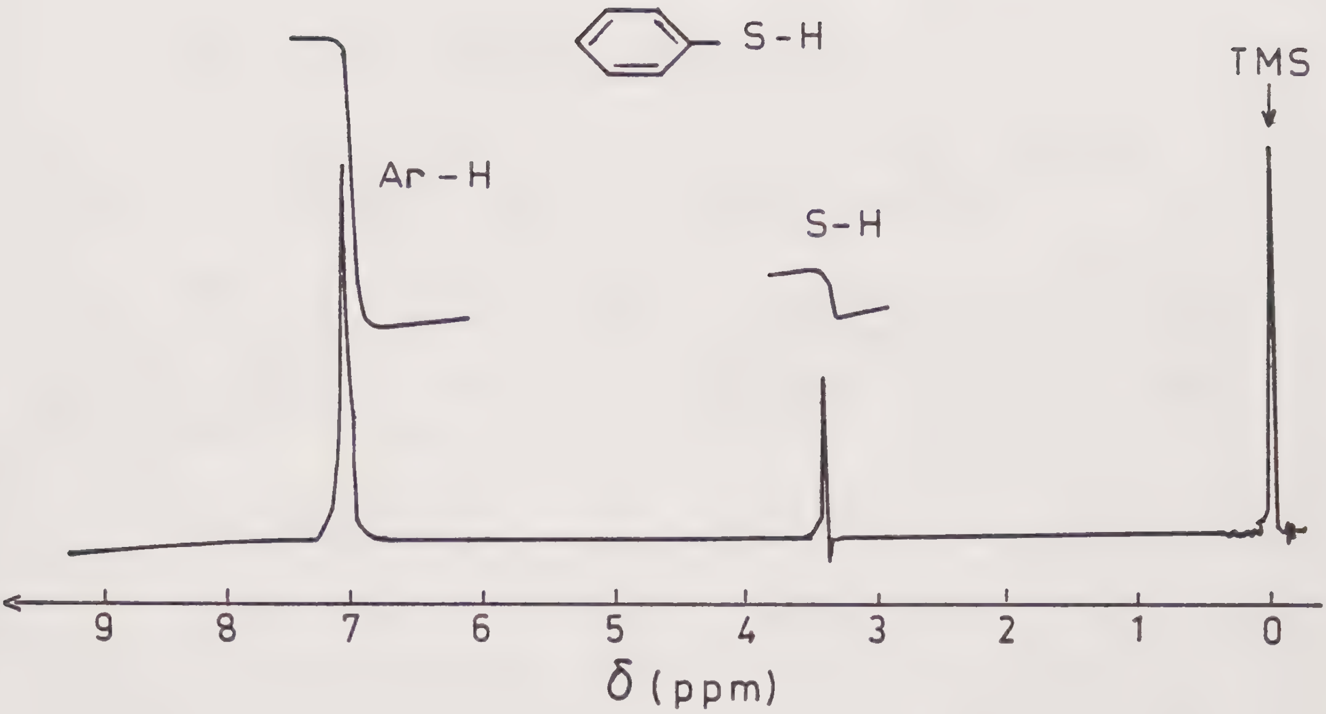
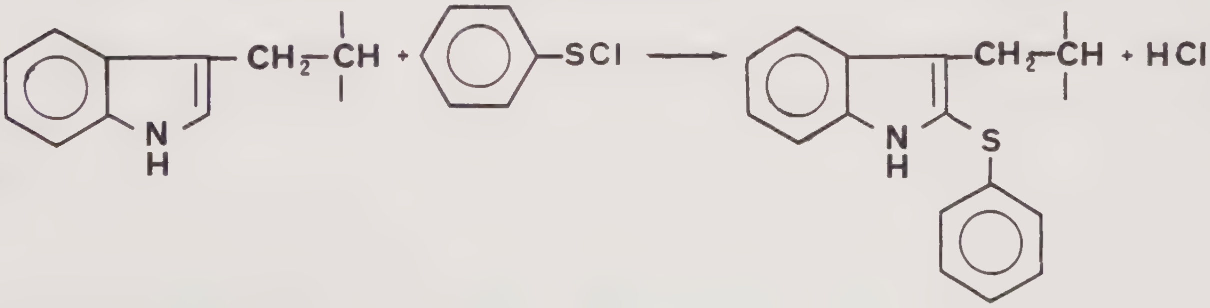


Figure 15 - Spectre de résonance magnétique du proton (à 60 MHz) du thiophénol (C_6H_5-SH) dans du CCl_4 en présence de TMS comme référence.

III.1.2.3 - Synthèse et caractérisation de la PGPS

Cette synthèse est réalisée par action du Phénylthiochlorure sur le Tryptophane de la Pentagastrine. Le PSCl réagit avec le noyau du noyau indole selon le même mécanisme que le NPSCl :



III.1.2.3.1 - Synthèse et purification

L'utilisation du PSCl préparé par les deux méthodes décrites précédemment conduit à un dérivé identique.

Afin d'éviter les risques de dégradations à l'air lorsque le réactif est distillé (première méthode) nous préconisons la deuxième méthode de préparation du phénylthiochlorure qui permet son utilisation directe.

- *MODE OPERATOIRE*

A une solution de Boc-PG (7,7 µmoles dissoutes dans 50 µl de Diméthylacétamide et 750 µl d'acide acétique distillé) on ajoute une solution de phénylthiochlorure (19,3 µmoles dans 250 µl de CCl_4 ou de chlorure de méthylène). Après 2 heures de réaction sous agitation magnétique et à la température ambiante le peptide est purifié par chromatographie sur silice 60, dans une colonne de verre (L = 50 cm, Ø = 20 mm) avec un mélange éluant B.A.W./Ethylacétate(10/90).

La pureté de la Boc-PGPS obtenue est vérifiée par chromatographie sur couche mince de silice. Le peptide est visualisé à la lumière U.V. et par révélation au TMD. Les R_f obtenus dans différents systèmes de solvant sont reportés ci-dessous :

Eluant	Boc-PG	Boc-PGPS	PSCl
B.A.W.-EtOAc 15:85	0,24	0,45	0,74
EPAW	0,53	0,74	0,97

La composition du peptide, vérifiée par analyse d'acides aminés après hydrolyse acide (HCl 6N, 24 h à 100°C, en présence

d'acide thioglycolique 4%), est identique à celle de la Pentagastrine, le PS étant dissocié dans ces conditions.

La pureté de la Pentagastrine PS a également été contrôlée par HPLC sur colonne analytique dans deux systèmes chromatographique :

1 - sur silice μPorasil en utilisant le mélange B.A.W.-Ethylacétate 15/85 comme éluant à 1,2 ml/mn.

2 - sur silice greffée μBondapak C18 avec un gradient de 80 % à 20 % d'acétate d'ammonium 0,01 M pH 4,7 dans l'acétonitrile en 20 mn, à 1,2 ml/mn.

Les temps d'élution de la Pentagastrine et de la Pentagastrine PS dansces systèmes sont les suivants :

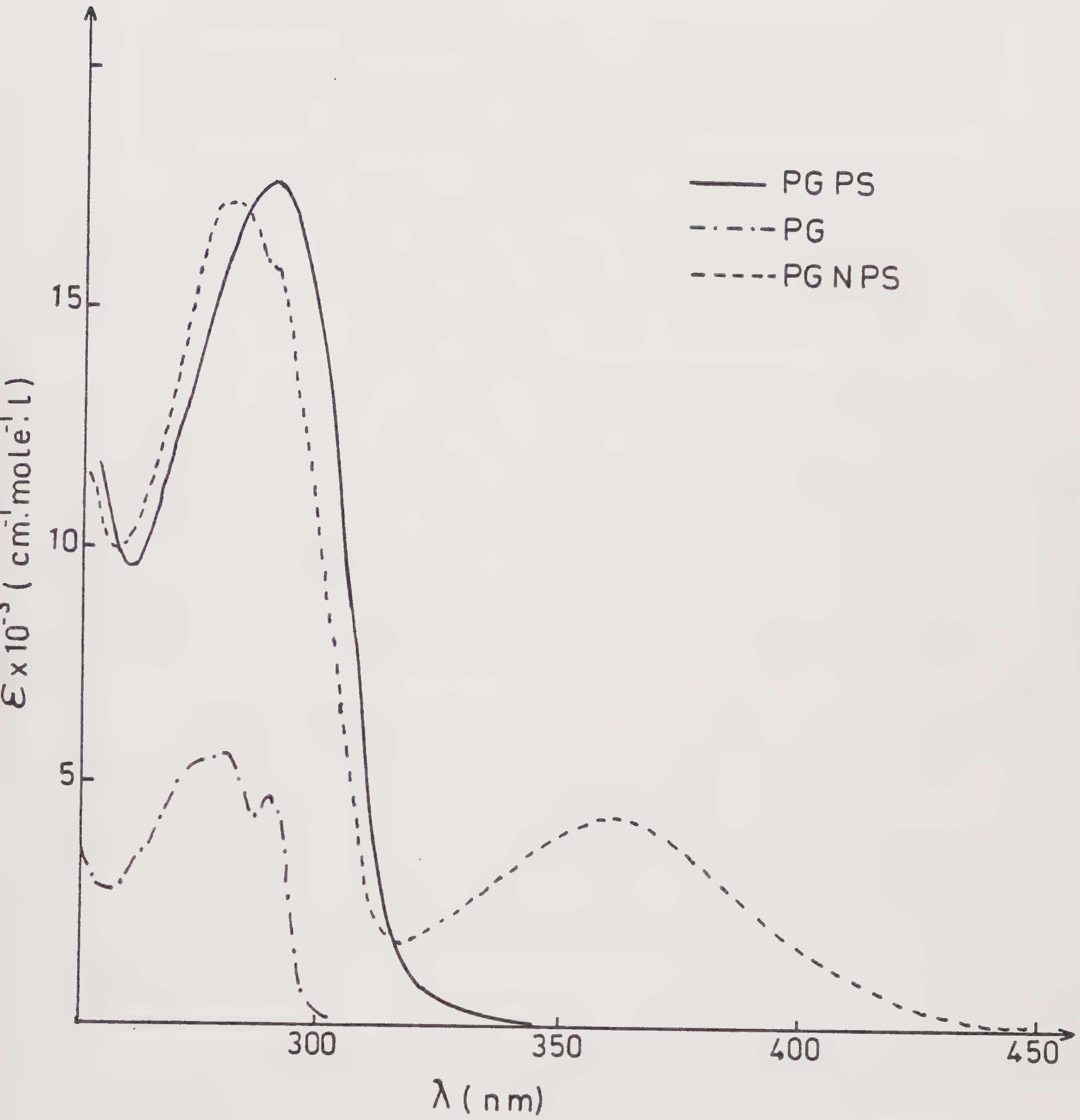
T_e (mn)	Boc-PG	Boc-PGPS
Système 1	5,0	3,1
Système 2	12,7	18,4

III.1.2.3.2 - Spectre d'absorption U.V.-visible

Le spectre d'absorption de la Pentagastrine PS présente un seul maximum à 290 nm, dont le coefficient d'extinction molaire a été calculé à :

$$\varepsilon_{290\ nm}\ (Trp(PS)) = 17\ 700\ cm^{-1}.mole^{-1}.1$$

La figure 16 donne la variation des coefficients d'extinction molaire de la PGPS, de la PGNPS et de la PG, dans le visible et l'U.V.



<u>Figure 16</u> - Spectres d'absorption de la phénylsulfénylpentagastrine (—) de la pentagastrine (——·——·) et de l'o-nitrophényl-sulfénylpentagastrine (---).

III.1.2.4 - Etude conformationnelle par dichroïsme circulaire

Le spectre de dichroïsme circulaire d'une solution de Phénylsulfényl-Pentagastrine dans le Trifluoroéthanol est reporté dans la figure 17 où l'on a également représenté le spectre de la PGNPS dissoute dans le même solvant, à titre de comparaison.

Les principaux signaux dichroïques de ces deux composés sont émis aux mêmes longueurs d'onde, sauf un léger décalage de 210 à 215 nm qui provient probablement de la différence d'absorption d'une transition B_b correspondant au tryptophane porteur des groupements NPS et PS. De même dans la région aromatique le signal dichroïque centré vers 275 nm et qui traduit principalement la contribution du Tryptophane est un peu plus large pour la Pentagastrine PS que pour la Pentagastrine NPS.

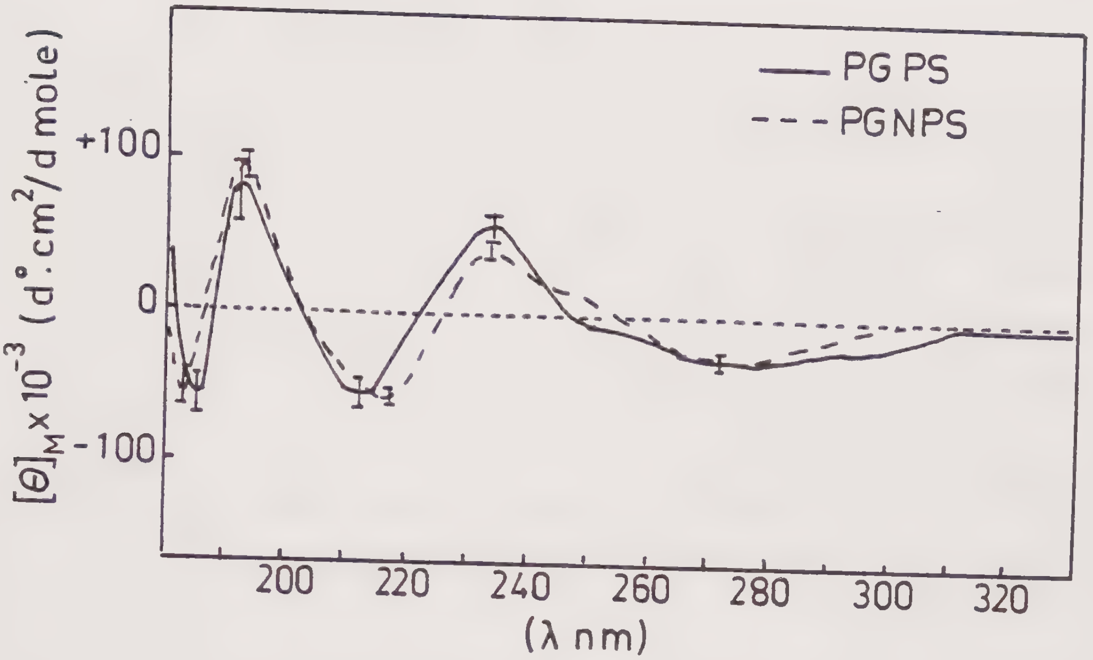
La similitude générale de ces deux spectres dichroïques montre que la conformation globale des deux composés est peu différente ; la suppression du groupement NO_2 (au niveau du phénylthioéther) ne modifie donc pratiquement pas la structure de la molécule en solution dans le TFE. Au niveau du récepteur il est vraisemblable que la Pentagastrine PS présente la même capacité de fixation au récepteur de la Pentagastrine que la Pentagastrine NPS.

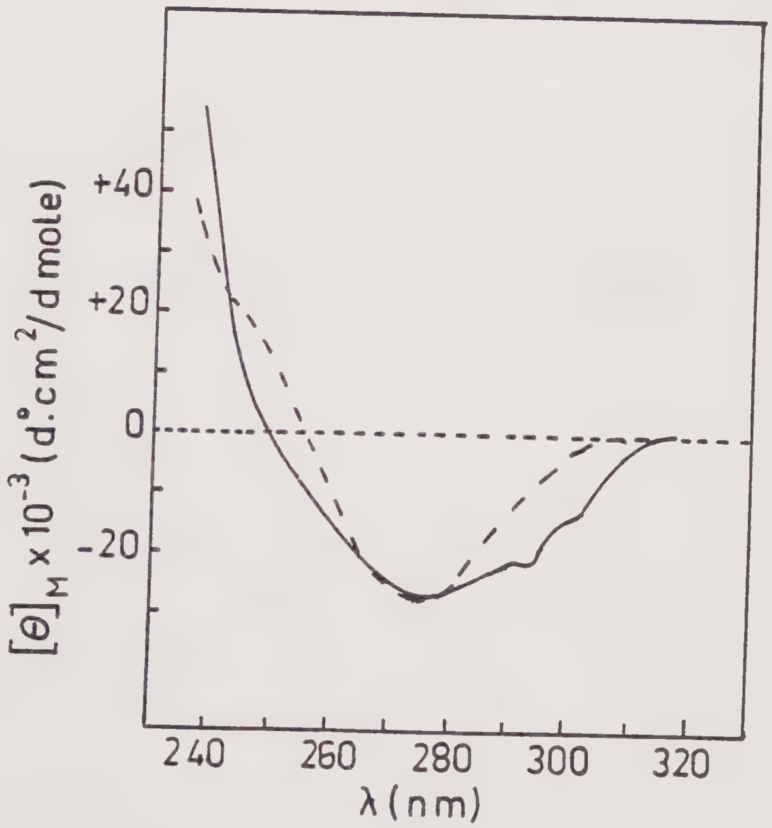
On devrait ainsi s'attendre à ce que la Pentagastrine PS se comporte comme un inhibiteur compétitif de la Pentagastrine, sans être un agoniste par lui-même.

III.1.2.5 - Etude biologique et radioimmunologique de la PGPS

III.1.2.5.1 - Activité biologique

L'activité biologique de la Pentagastrine PS a été étudiée par injection simultanée de ce dérivé à des doses crois-





<u>Figure 17</u> - Spectres de dichroïsme circulaire de la PGPS (——) et de la PGNPS (-----) dans le trifluoroéthanol.

santes et d'une quantité constante de Pentagastrine. Lorsque la Pentagastrine est injectée à la dose de 20,8 nmoles/kg (à cette dose la secrétion acide a atteint son plateau et l'on peut donc étudier le déplacement de l'agoniste par la Pentagastrine PS). Les résultats obtenus (figure 18) montrent que les doses croissantes de PGPS (0, 1,3 , 5,2 et 20,8 nmol/Kg) injectées simultanément à la Pentagastrine, entraînent une diminution de la secrétion acide allant jusqu'à 60 % d'inhibition de la secrétion initiale (agoniste seul) lorsque PG et PGPS sont injectées en rapport equi-molaire. Ainsi à cette dose le pouvoir inhibiteur de la PGPS est comparable à celui de la PGNPS.

Cette courbe dose-réponse révèle le caractère antagoniste de la Pentagastrine PS.

Ce pouvoir inhibiteur de la Phénylsulfényl-Pentagastrine a été également vérifié à des doses plus faibles de Pentagastrine.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous :

PG (nmoles/kg)	0		1,3		5,2	
PGPS (nmoles/kg)	1,3	5,2	1,3	5,2	1,3	5,2
$\bar{X}$ (µeq H^+/40 mn)	0,9	0,3	9,8	6,5	16,1	12,8
± ESM	±1,3	0	0,1	±3,9	±5,0	±4,4
n (nombre d'essais)	3	1	2	3	5	3

Ces résultats confirment l'hypothèse suggérée par la similitude des structures de la Pentagastrine NPS et de la

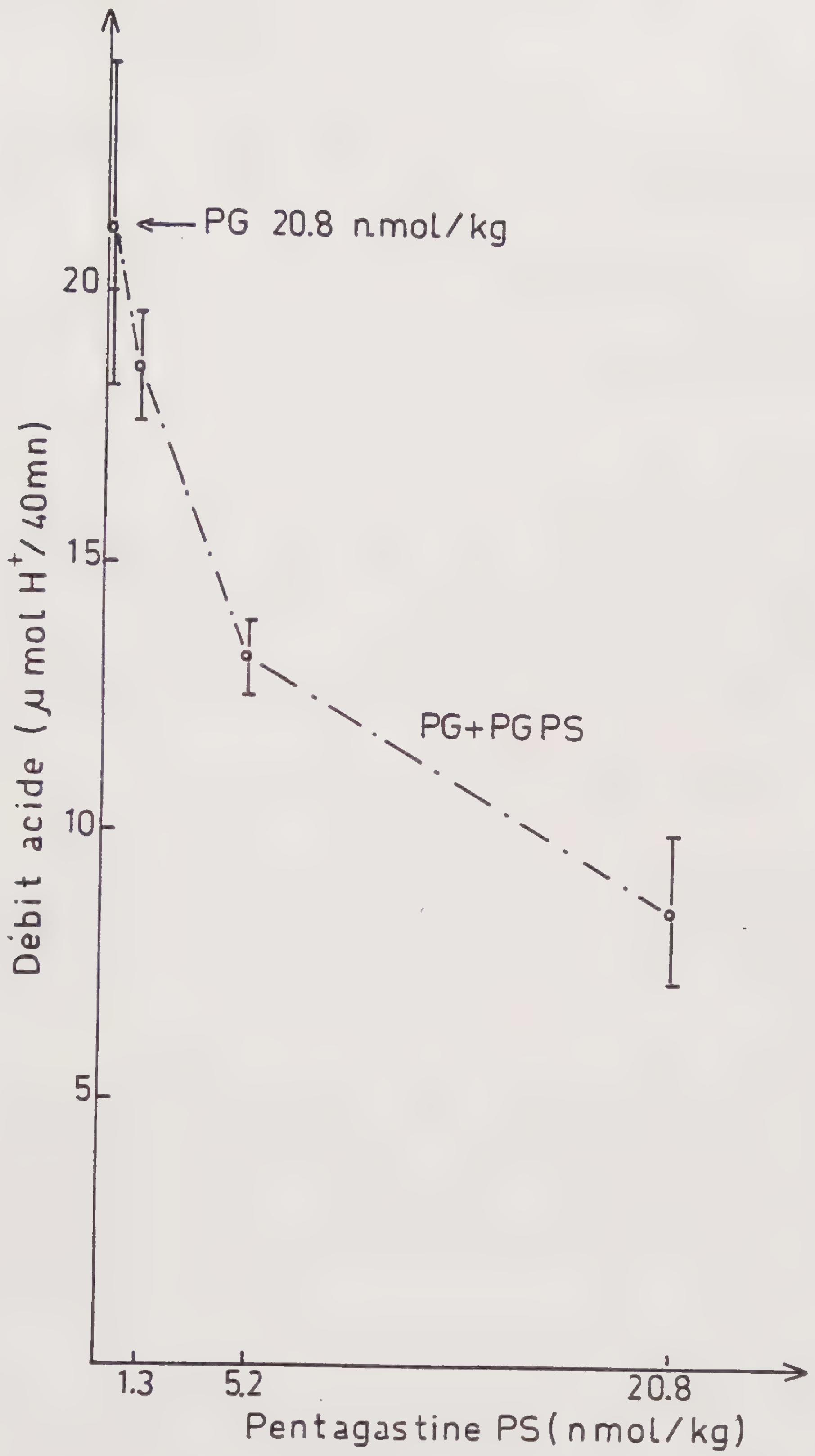


Figure 18 - Courbe dose-réponse de la Pentagastrine PS injectée simultanément à 20.8 nmol/kg de Pentagastrine. (n = 5)

Pentagastrine PS et montrent que le groupement NO_2 n'est pas responsable du pouvoir antagoniste de la Pentagastrine NPS.

Dans les deux cas les groupements NPS et PS empêchent probablement, par leur encombrement sur le C_2 du noyau indolique, la fixation au récepteur d'un (ou des) groupement(s) important(s) pour l'activité secrétoire.

Si ce composé PGPS offre les mêmes possibilités d'administration orale que la PGNPS (ce qui est probable puisque l'encombrement du PS, similaire à celui du NPS, doit également protéger le peptide de l'hydrolyse enzymatique par la pepsine intragastrique), il pourrait être considéré comme médicament potentiel de l'hypersecrétion acide de l'estomac.

III.1.2.5.2 - Dosage radioimmunologique

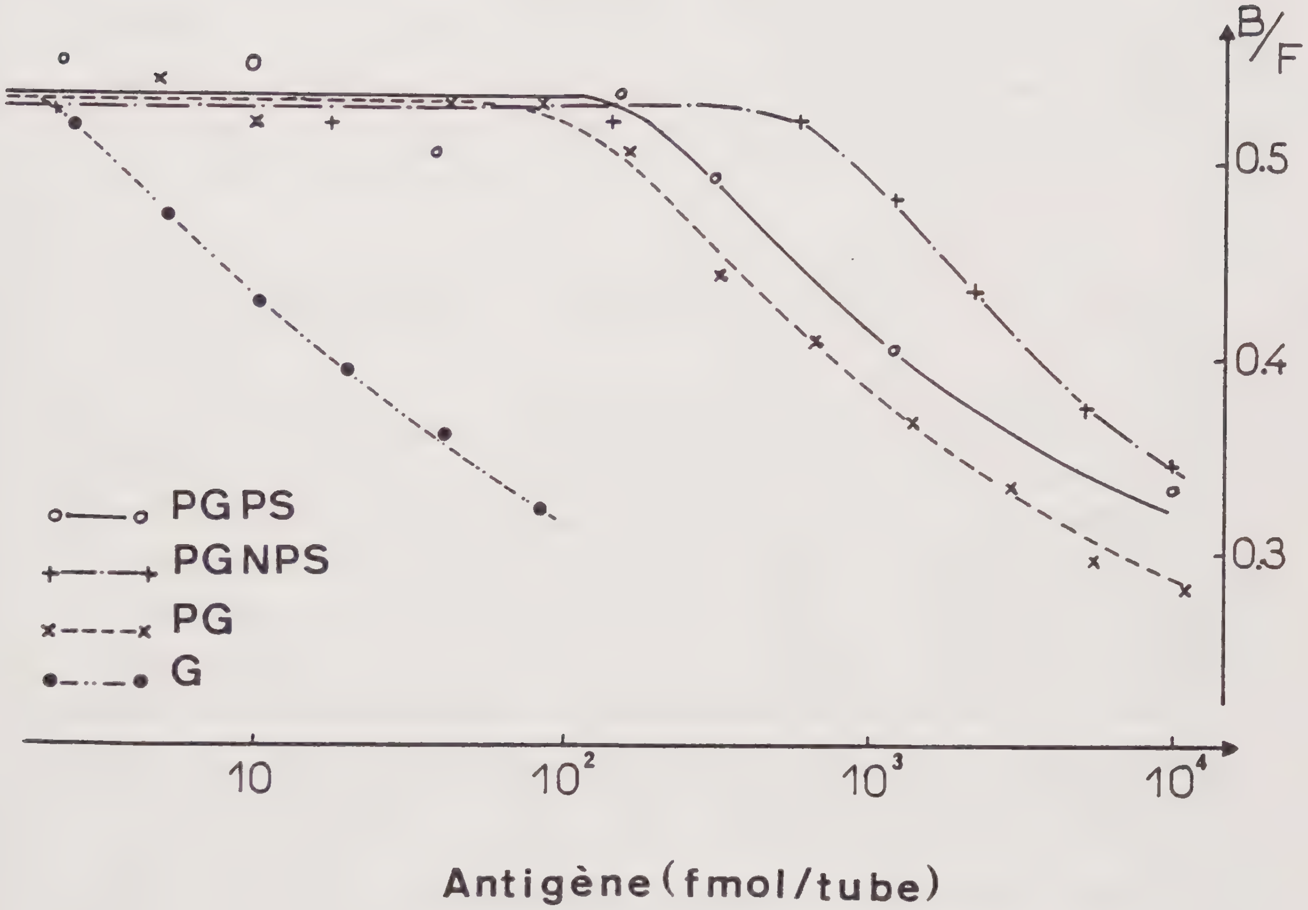
La courbe de déplacement par la Pentagastrine PS de la Gastrine marquée (I^{125}) liée à des anticorps antigastrine a été comparée à celles obtenues par la Pentagastrine, la Pentagastrine NPS et la Gastrine (figure 19).

D'après nos résultats les anticorps antigastrine reconnaissent non seulement la G.17 mais aussi la Pentagastrine et ses dérivés (avec évidemment une moins bonne affinité). La Pentagastrine et la PGPS ont une capacité à se lier à ces anticorps à peu près semblable, le dérivé NPS étant légèrement moins bien reconnu.

Ces résultats indiquent que :

1) les anticorps utilisés et qui ont été dirigés contre la Gastrine G.17 possèdent un site de reconnaissance du tronçon C-terminal.

2) ce site de reconnaissance est probablement constitué d'une poche hydrophobe qui reconnaît globalement la conformation compacte de la PG et non pas les chaînes latérales séparément.



<u>Figure 19</u> - Courbes de dosage radioimmunologique de la Gastrine (•-··-•) de la PG (×----×), de la PGPS (o——o) et de la PGNPS (+-·-—+) (Anticorps anti-gastrine G.17).

3) la présence des groupements PS et NPS perturbe peu la conformation en solution de PG, ce qui confirme l'analogie conformationnelle observée par dichroîsme circulaire.

Bien que site récepteur et site antigénique d'un polypeptide soient généralement différents, dans le cas présent où le site biologique est confiné dans le petit fragment tétrapeptidique C-terminal, il est probable que l'on soit en présence d'un même type de site.

III.2 - MODIFICATIONS DE L'ACIDE ASPARTIQUE

Morley / 65 / a montré que le résidu aspartyle est un élément essentiel de la Pentagastrine. En effet, les modifications de ce résidu réalisées jusqu'à présent,telles que l'extension de la chaîne latérale (Asp remplacé par un résidu β-aminoglutaryle ou par Glu), la formation d'un amide (Asp remplacé par Asn), l'échange du groupe carboxyle par un groupement acide sulfonique, amino, hydroxyle ou méthyle, etc..., entraînent la perte de l'activité stimulant la secrétion gastrique. Or si l'on examine le modèle moléculaire proposé (1) pour la conformation de la Tétragastrine, la chaîne latérale de l'acide aspartique ne contribue pas directement à la stabilisation de la conformation du peptide. Cette remarque permet de penser que les modifications que l'on peut apporter à la chaîne latérale du résidu aspartyle altéreront au premier chef les interactions propres de cette chaîne latérale avec le récepteur. Il est ainsi possible que l'on puisse dissocier la reconnaissance spécifique du peptide entier par le récepteur du déclenchement de l'activité biologique qui pourrait être altéré ou aboli par les modifications de l'acide aspartique. Si tel était le cas on aurait identifié une nouvelle voie d'obtention d'inhibiteurs de la Pentagastrine.

Pour éprouver cette hypothèse, nous avons synthétisé deux dérivés de la Pentagastrine au niveau de l'acide aspartique :

- L' (aminosuccinyl^{4})-Pentagastrine ou PGAsu dans laquelle la chaîne latérale de l'acide aspartique est cyclisée.

- La Pentagastrine-Histamine ou PG-Hist provenant de la condesation du groupement aminé de l'Histamine au carboxyle β du résidu Asp de la Pentagastrine.

III.2.1 - <u>(Aminosuccinyl^{4})-Pentagastrine (PGAsu)</u>

La cyclisation de la chaîne latérale des résidus aspartyles par acylation du groupement amino du résidu suivant dans une séquence peptidique se produit spontanément au cours du temps / 50, 51 / mais elle est largement facilitée par la présence d'un ester ^{t}Butylique ou Benzylique sur le groupement β-carboxyle.

La transformation de ces esters (Asp O^{t}Bu, Asp O Bzl) est alors catalysée soit en milieu acide, soit en milieu basique / 14 / selon le schéma de la figure 20.

Le dérivé formé est mis en évidence notamment par son comportement chromatographique sur couche mince et par la présence d'une bande imide en infrarouge, à 1 780 cm^{-1}, caractéristique des cycles succinimides.

III.2.1.1 - <u>Synthèse</u>

Dans le cas de la Pentagastrine nous avons suivi les deux voies catalytiques pour obtenir l'analogue succinimide. Celui-ci a été caractérisé par IR, CCM (systèmes EtoAc/P.A.W. (20.6.11) : 9/1 et EtoAc/B.A.W. : 85/15), analyse d'acides aminés et HPLC (sur colonne analytique μ-Bondapak C18 avec un gradient d'élution de 10 % à 90 % d'acétonitrile dans un tampon triéthylaminephosphate 0,1 M pH 2,2, en 20 mn, à un débit de 1,2 ml/mn).

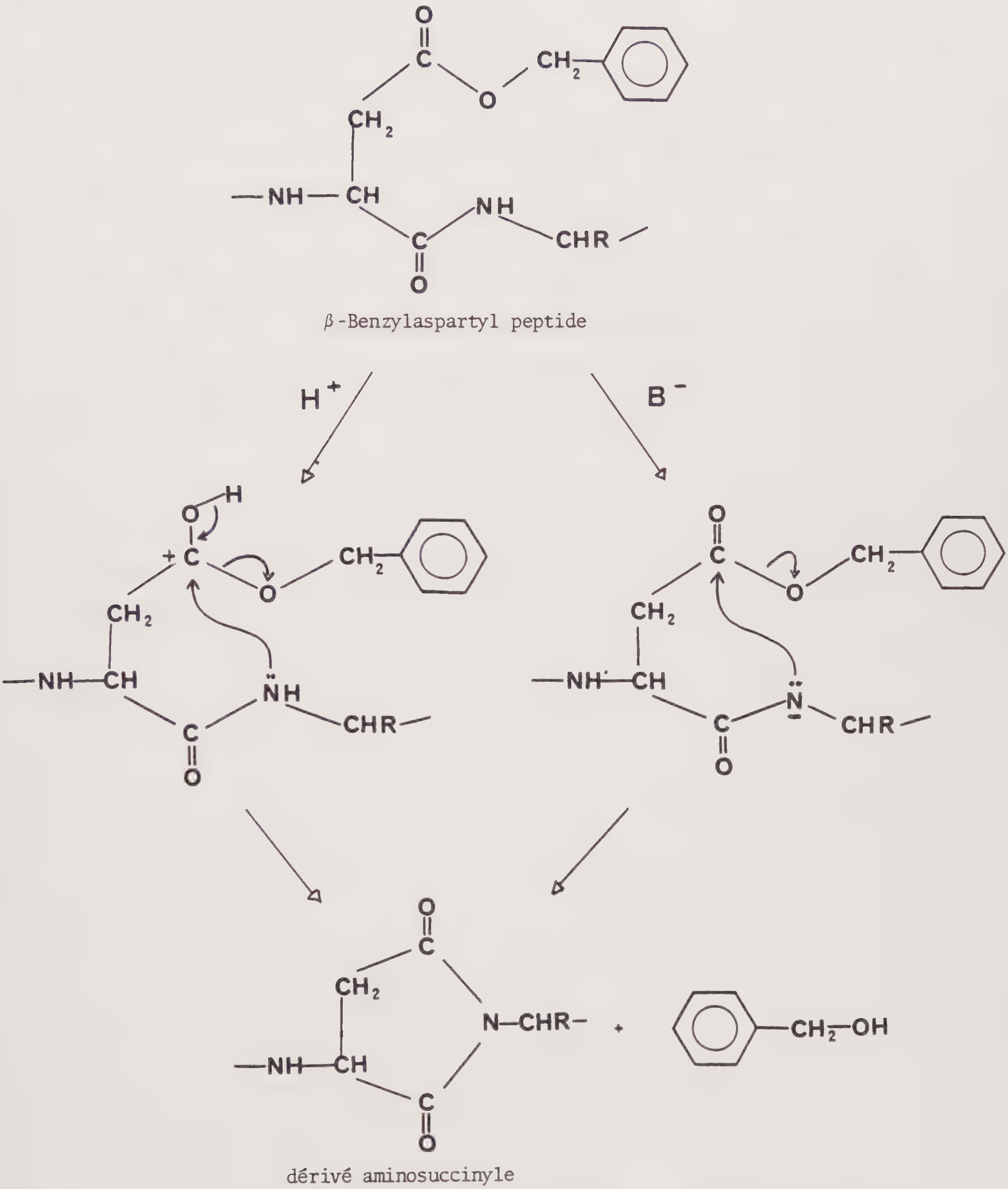


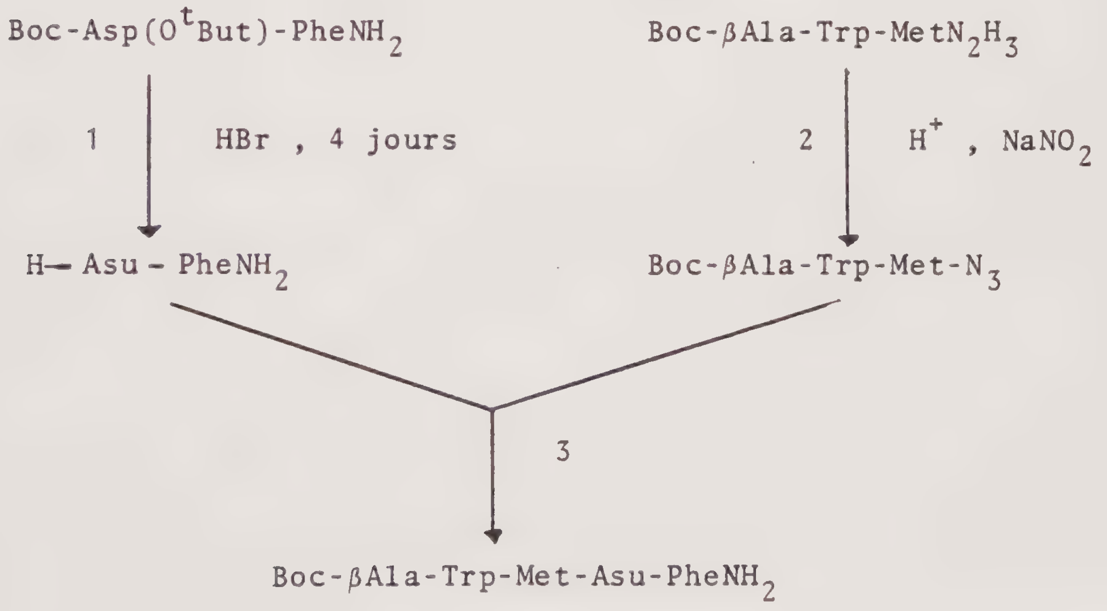
Figure 20 - Cyclisation des peptides β-Benzylaspartyles catalysée en milieu acide ou basique .

III.2.1.1.1 - En milieu acide

La formation du dérivé succinimide en milieu acide nécessite un traitement par un acide fort (HCl, HBr) pendant 4 à 5 jours / 80 /.

Dans le cas de la Pentagastrine ce traitement ne peut pas être appliqué directement sur un ester ^{t}Butylique ou Benzylique du pentapeptide, celui-ci contenant des acides aminés sensibles aux acides forts (Méthionine, Tryptophane). Il est donc nécessaire de procéder par étapes comme l'ont préconisé Schön et al. / 77 /.

La synthèse de Pentagastrine-Asu a été ainsi réalisée à partir du peptide Boc-Asp ($O^{t}Bu$)-Phe-NH_2, qui, après traitement par HBr, a été couplé au tripeptide Boc-βAla-Trp-Met-N_2H_3 par la méthode azide, selon le schéma suivant :



Les rendements obtenus étant respectivement de 70 % par la réaction 1 et de 12 % pour les réactions 2 + 3 ,

le faible rendement global (8,4 %) nous a conduit à synthétiser le dérivé PG Asu par une deuxième méthode.

III.2.1.1.2 - En milieu basique

La préparation du dérivé succinimide peut être réalisée directement par cyclisation, en milieu basique, de l'ester β-Benzylaspartyl -Pentagastrine sans risque de dégradation du peptide.

III.2.1.1.2.1 - Etude préliminaire

Nous avons tout d'abord étudié, à l'échelle analytique, la cinétique de transformation de l'ester Benzylique en succinimide.

2 mg (2,5 µmoles) de Boc-βAla-Trp-Met-Asp (OBzl)-Phe NH_2 dissous dans 250 µl de diméthylformamide sont mis en présence de 5 µmoles de triéthylamine. Le mélange est maintenu sous agitation constante à température ambiante.

Des prélèvements de la solution réactionnelle sont réalisés à des temps donnés pour suivre l'avancement de la réaction par HPLC. Dans le système chromatographique utilisé, les temps d'élution des dérivés β-Benzylaspartyle et aminosuccinyle de la Pentagastrine sont respectivement T_R (PG(AspOBzl)) = 21.74 mn et T_R (PG Asu) = 19.93 mn.

La cinétique de transformation de PG(AspOBzl) en PGAsu est représentée sur la figure 21 ainsi que celle de son analogue Boc-Gly-Trp-Met-Asp(OBzl)-PheNH_2 en son dérivé succinyle. Ces deux esters benzyliques se cyclisent respectivement à 75 % et 80 % en 48 heures.

Dans les mêmes conditions la Pentagastrine non estérifiée ne se transforme pas en PGAsu, même après 48 heures d'incubation dans le milieu basique.

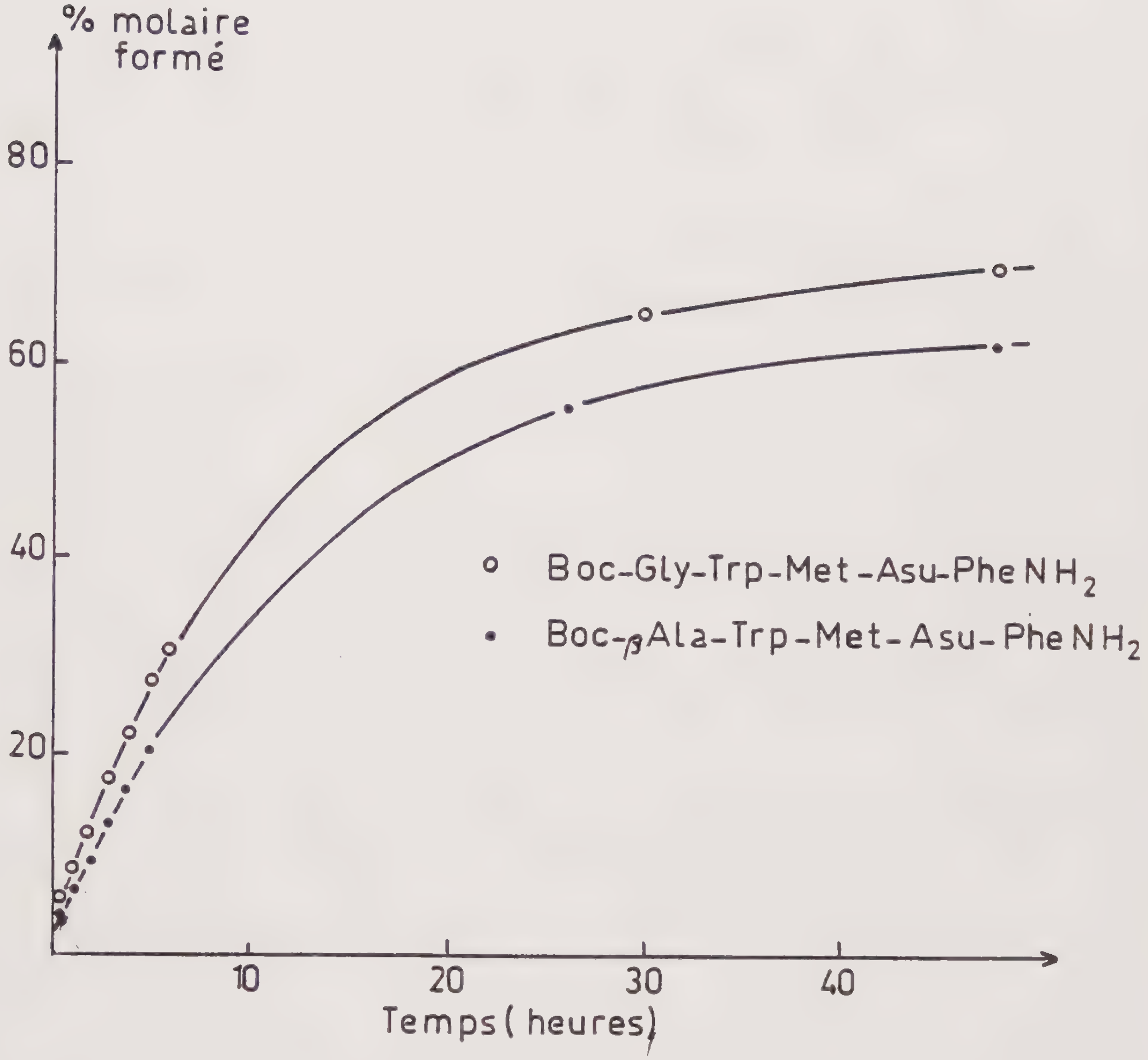
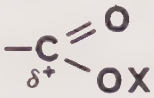


Figure 21 - Cinétiques de transformation des esters benzyliques Boc-Gly-Trp-Met-Asp(OBzl)-PheNH_2 et Boc-βAla-Trp-Met-Asp(OBzl)-PheNH_2 en leurs analogues succinyles Boc-Gly-Trp-Met-Asu-PheNH_2(o) et Boc-βAla-Trp-Met-Asu-PheNH_2(•) (PGAsu).

De même, les esters β-tert-butylaspartyles de la Pentagastrine ou de ses analogues, Boc-βAla-Trp-Met-Asp(O^{t}But)-PheNCH$_3$ et Boc-βAla-Trp-Met-Asp(O^{t}But)-PheCOOH n'ont donné lieu, dans les mêmes conditions expérimentales, qu'à une transformation négligeable (inférieure à 2 %) après 48 heures.

La vitesse décroissante de la formation du dérivé Asu à partir des différents esters selon l'ordre Asp(OBzl) > Asp (O^{t}But) > Asp-OH s'explique par l'ordre identique de leur capacité à former un carbocation  en β de la chaîne aspartique qui puisse réagir avec l'amine de la Phénylalanine.

Nous nous sommes demandés si des fragments peptidiques plus courts que la Pentagastrine, contenant Asp(OBu) ou Asp(OBzl) pouvaient se transformer en Asu lorsque le peptide est en solution dans le DMF en présence de triéthylamine, conditions qui sont fréquemment utilisées en synthèse peptidique.

Nous avons alors examiné la cinétique de succinylation, par HPLC, des dipeptides Boc-Asp(OBzl)-PheNH$_2$ et Z-Asp(OBzl)-Phe-NH$_2$ et des tripeptides Boc-Met-Asp(OBzl)-Phe-NH$_2$ et Z-Leu-Asp(OBzl)-Phe-NH$_2$. Après 48 heures la transformation en Asu est négligeable (< 1 %) pour ces di et tripeptides.

Ces résultats suggèrent que l'accès du β-carboxyle au groupe amino N$_\alpha$H (Phe) est plus facile pour la PG que pour les peptides plus courts étudiés. En effet, d'après le modèle moléculaire proposé pour PG, la chaîne latérale du résidu Asp n'est pas impliquée dans la structure repliée et peut tourner librement. Par contre cette rotation est peut être empêchée au sein des di ou tripeptides par des interactions hydrophobes entre le benzyl ester et les chaînes latérales de la Phénylalanine , de la méthionine ou de la leucine, les di et tripeptides étant probablement trop courts pour définir une structure maintenue par des interactions entre ces chaînes latérales.

III.2.1.1.2.2 - Préparation de PGAsu

Nous avons donc choisi la méthode de cyclisation de l'ester benzylique en milieu basique pour la préparation d'une quantité plus importante d'aminosuccinyl-Pentagastrine.

Ainsi 20 mg (23,3 µmoles) de Boc-βAla-Trp-Met-Asp(OBzl)-Phe-NH_2 dissous dans 110 µl de Diméthylformamide ont été mis en présence de 5 équivalents de triéthylamine.

Après 72 heures de réaction la Boc-βAla-Trp-Met-Asu-Phe-NH_2 formée a été purifiée sur une colonne HPLC préparative µBondapack C18 par un gradient d'élution d'acétate d'ammonium 0,05 M pH 4,7 dans l'acétonitrile de 68 % à 30 % pendant 20 mn puis de 30 % à 20 % pendant 5 mn.

Le pic de PGAsu détecté à 280 nm après un temps d'élution T_e = 18,85 mn a été collecté et ainsi séparé de l'ester benzylique résiduel (20 %) élué à T_e = 23,08 mn.

La pureté de PGAsu a été contrôlée par CCM, HPLC, analyse d'acides aminés et par spectroscopie d'absorption.

III.2.1.2 - Etude conformationnelle par dichroïsme circulaire

Le spectre de dichroïsme circulaire du dérivé PGAsu dissous dans le Trifluoroéthanol, présenté sur la figure 22, est totalement différent de celui de la Pentagastrine. Bien que l'interprétation exacte des variations d'ellipticité observées ne soit pas simple en raison de la superposition des contributions des chromophores aromatiques et des chromophores peptidiques dans l'ultraviolet lointain, on note en premier lieu l'intensité des bandes négatives à 190 nm et 215 nm. Une très importante contribution des chromophores aromatiques en situation bloquée est nécessaire pour parvenir à une telle ellipticité et, par voie de conséquence, implique une rigidité du squelette

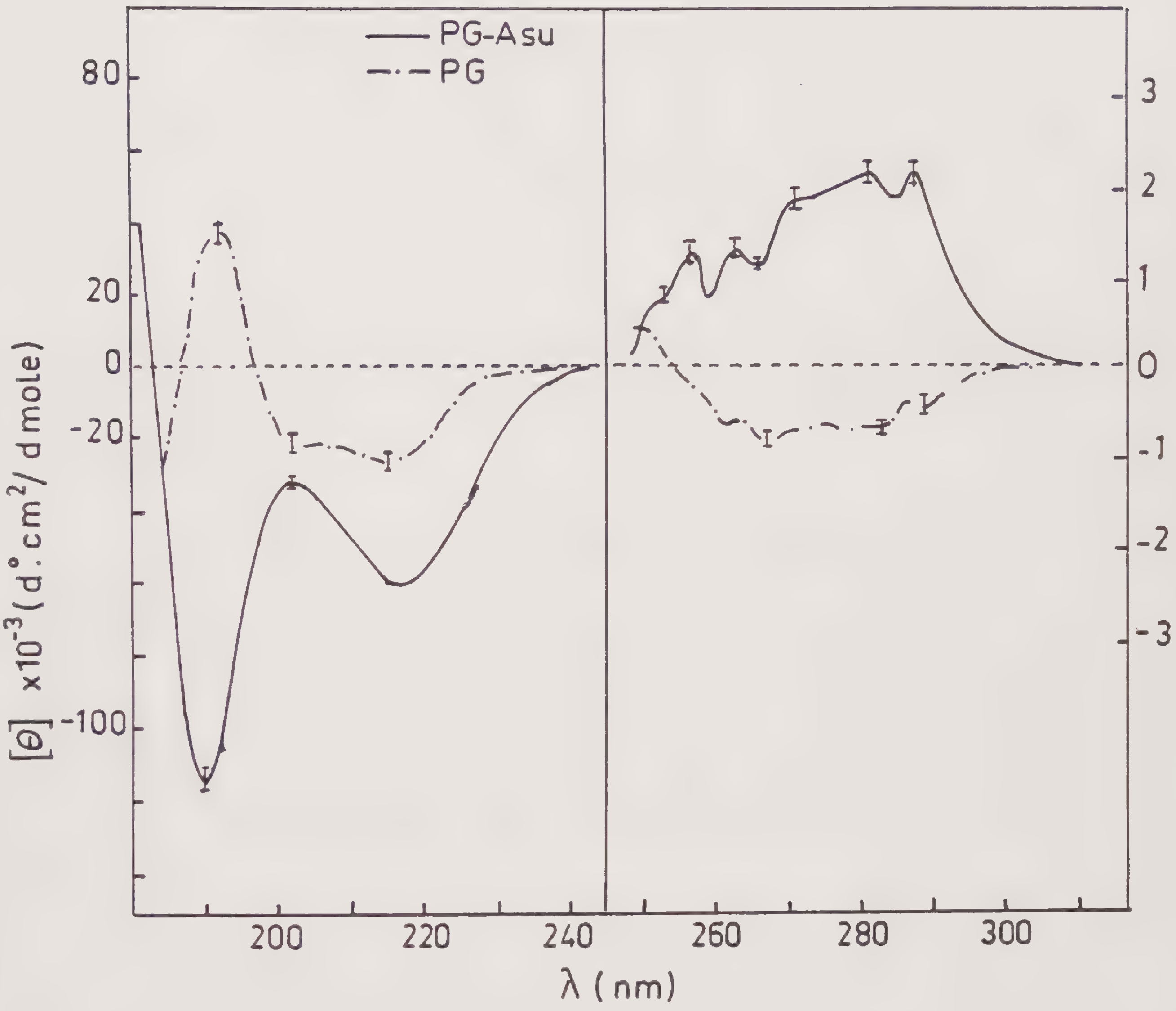


Figure 22 - Spectres de dichroïsme circulaire de PGAsu (——) et de PG(—·—·) dans le trifluoroéthanol.

peptidique et une forte contribution de celui-ci. Le cycle formé est d'ailleurs en grande partie responsable de cette rigidité du squelette peptidique. L'examen des spectres dans la région aromatique vient confirmer ces conclusions. En effet, le changement de signe du spectre et son intensification démontrent que les noyaux du tryptophane et de la phénylalanine ont changé d'orientation et sont maintenus en position très peu mobile.

Ainsi la présence du cycle aminosuccinyle modifie considérablement la conformation du peptide non seulement au niveau du squelette peptidique mais également des chaînes latérales aromatiques.

Par ailleurs, en construisant le modèle moléculaire de la Pentagastrine Asu on constate que la formation du cycle succinimide entraîne une grande rigidité de l'extrémité Asu-Phe-NH_2. Le noyau benzénique de Phe se trouve replié sur le cycle succinimide et pour tenir compte des résultats de dichroïsme circulaire, qui reflètent une forte interaction entre les noyaux aromatiques du Tryptophane et de la Phénylalanine, un repliement (type C_7) de la molécule PGAsu au niveau de la Méthionine est nécessaire.

On a alors la superposition de deux noyaux aromatiques qui délimitent une région hydrophobe , toutefois plus réduite que dans le cas de la Pentagastrine, la chaîne latérale de la Méthionine étant pointée vers l'extérieur de la molécule PGAsu. Il n'y a plus de région hydrophile bien définie et la conformation compacte obtenue par ce modèle est différente de celle de la Pentagastrine.

Ces observations suggèrent, dans l'éventualité où PGAsu arrive intacte au niveau du récepteur physiologique, une difficile reconnaissance de ce dérivé par le récepteur de la Pentagastrine et, en tous cas, une absence d'effet agoniste.

III.2.1.3 - Activité biologique

L'aminosuccinyl-Pentagastrine (PGAsu) a été étudiée pour son activité biologique sous deux angles : son pouvoir agoniste et son pouvoir antagoniste.

III.2.1.3.1 - Recherche d'un effet agoniste

Des injections uniques de PGAsu ont été administrées à trois doses différentes : 0,39 nmole/kg, 3,51 nmoles/kg et 10,53 nmoles/kg.

Les moyennes ($\bar{X} \pm$ ESM) des réponses secrétoires obtenues sur n rats pour chacune de ces doses, et expriméesen µmoles H^+/ 40 mn, sont reportées dans le Tableau 3. Les réponses secrétoires à la Pentagastrine aux mêmes doses sont données comme référence.

TABLEAU 3

$\bar{X}$ ± ESM	0,39 nmole/ kg	3,51 nmoles/kg	10,53 nmoles/kg
PGAsu	- 2,1 ± 1,7 (n =4)	- 1,2 ± 1 (n =3)	4,4 ± 4,9 (n =5)
PG	3,8	11,5	13,6

L'aminosuccinyl-Pentagastrine ne stimule pas la secrétion gastrique acide même aux doses où la Pentagastrine a déjà atteint son plateau de secrétion.

La Pentagastrine Asu n'est donc pas un agoniste de la Pentagastrine.

Ce résultat ne peut donner aucune information sur la reconnaissance ou la non-reconnaissance du dérivé Asu par le récepteur mais confirme que même si la PGAsu s'y fixe, la modification du résidu aspartyle empêche le déclenchement de l'activité biologique.

III.2.1.4.2 - Recherche d'un effet antagoniste

Le pouvoir antagoniste de PGAsu a été recherché par injection de ce dérivé sur deux plateaux de secrétion de Pentagastrine perfusée.

Sur un plateau de Pentagastrine à 1,3 nmole/kg/h l'injection de PGAsu à la dose de 5,2 nmoles/kg a entraîné une inhibition de 21,8 $\pm$ 2,6 %, en moyenne sur dix résultats, de la secrétion stimulée.

Sur un plateau de Pentagastrine à 0,16 nmole/kg/h l'injection de PGAsu à la dose de 1,3 nmole/kg,donc dans un rapport encore deux fois plus grand que précédemment, a provoqué une inhibition du même ordre, soit 22,8 $\pm$ 5,8 %, en moyenne sur six valeurs, de la secrétion.

La conformation du dérivé Asu étant apparemment difficilement compatible avec une bonne fixation sur le récepteur il est surprenant d'obtenir une inhibition qui, bien que peu importante, est cependant signficative. Celle-ci peut être attribuée à différents phénomènes :

- soit le récepteur parvient tout de même à reconnaître partiellement le dérivé Asu.
- soit la PGAsu subit in vivo une ou plusieurs transformations.

En effet, en milieu aqueux le cycle succinimide peut être hydrolysé / 14 / et conduire à deux composés selon la coupure du cycle, les dérivés α- ou β-aspartyles (schéma 3).

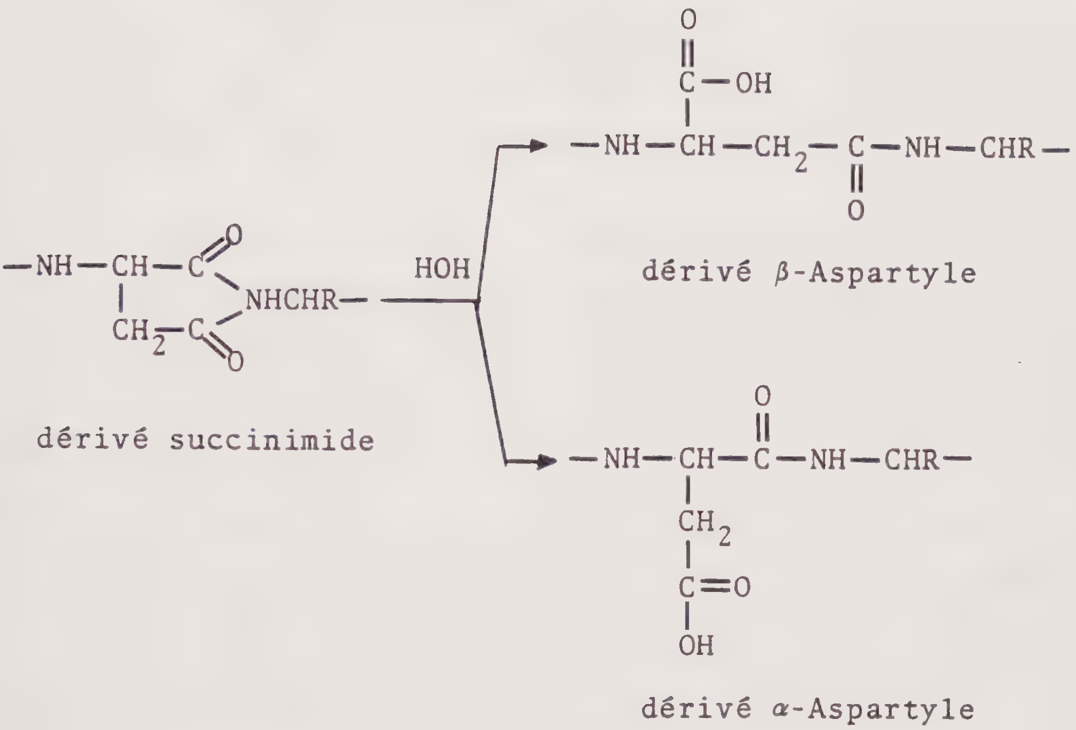


Schéma 3

Dans le cas de PGAsu le dérivé α-Aspartyle correspond à la Pentagastrine tandis que le dérivé β-Aspartyle, largement majoritaire dans ce type d'hydrolyse / 4 / pourrait être responsable de l'inhibition observée.

III.2.2 - Pentagastrine-Histamine (PG-Hist)

Le modèle de conformation de la Pentagastrine proposé par Abillon et al. / 1 / indique que l'extrêmité de la chaîne latérale de l'acide aspartique est, en première analyse, directement accessible et ne participe pas à la conformation du peptide. Une substitution du groupe β-carboxylique pourrait ainsi ne pas altérer la conformation globale de la molécule, et préserver sa fixation spécifique. Comme on sait que le groupe β-carboxylique de l'acide aspartique est nécessaire au déclenchement de la réponse biologique, une substitution à ce niveau pourrait conduire à l'obtention d'un antagoniste de la Pentagastrine.

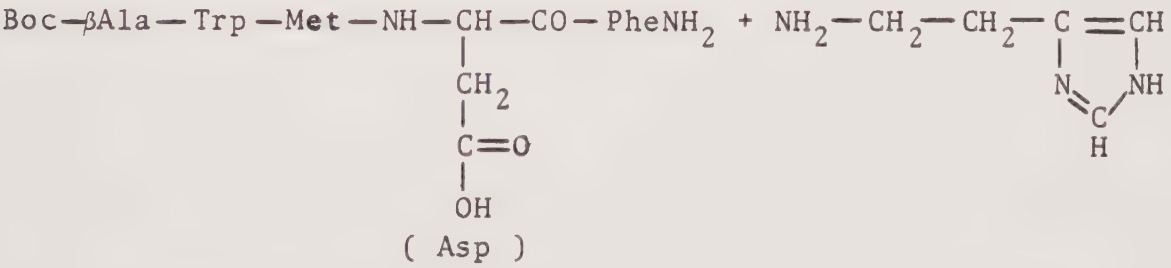
Nous avons choisi dans ce but de condenser le groupe β-carboxylique du résidu aspartyle de la Pentagastrine avec l'amine primaire de l'Histamine. Le nouveau peptide obtenu, appelé Pentagastrine-Histamine (PG-Hist), présente par surcroît d'autres aspects intéressants potentiels :

- il pourrait être non seulement antagoniste de la Pentagastrine mais également de l'Histamine puisque dans ce composé l'Histamine perd son extrêmité chargée sur sa chaîne aliphatique tout en conservant son cycle imidazole comme dans le cas d'antihistaminiques H_2 tels que le Burimamide ou la Cimétidine.

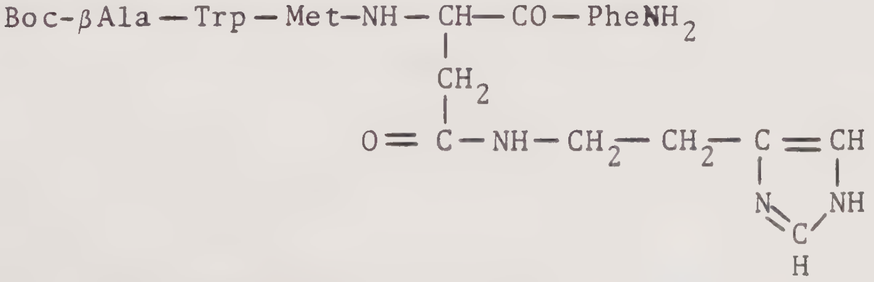
- l'Histamine peut servir de vecteur de marquage à l'Iode-125 et permettre alors l'utilisation de PG-Hist* comme traceur. Elle peut également servir d'intermédiaire pour des couplages de la Pentagastrine ou de ses dérivés à une macromolécule antigénique.

III.2.2.1 - Synthèse

Le principe de synthèse du dérivé PG-Hist est la fixation de l'Histamine à l'acide aspartique de la Pentagastrine par couplage des groupements respectifs amino et carboxylique :



Pentagastrine Histamine



Pentagastrine-Histamine (PG-Hist)

Plusieurs méthodes sont théoriquement utilisables pour réaliser ce couplage. Nous en avons essayé deux : la première passant par l'intermédiaire d'un anhydride mixte et la deuxième utilisant un carbodiimide.

III.2.2.1.1 - Essai de synthèse par l'anhydride mixte

Le choix de cette méthode repose sur le faible taux de racémisation qu'elle peut induire pendant le couplage.

La formation d'une liaison peptidique par la méthode de l'anhydride mixte implique deux étapes séparées :

1°- l'activation d'un groupement carboxylique par formation d'un anhydride mixte.

2°- le couplage de l'anhydride ainsi formé avec un groupement amine.

L'étape d'activation (Schéma 4) est réalisée par l'addition d'un chlorure d'ester monoalkylé au composé carboxyle, à froid et dans un solvant organique anhydre, en présence d'une base tertiaire.

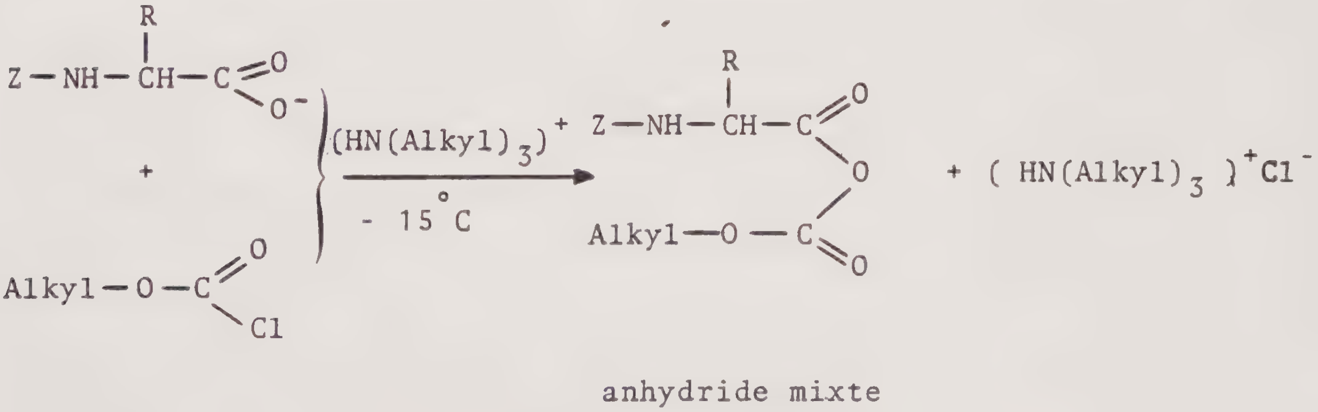


Schéma 4

La formation de la liaison peptidique (Schéma 5) par couplage à l'amine s'effectue ensuite rapidement avec libération de dioxyde de carbone et d'alcool.

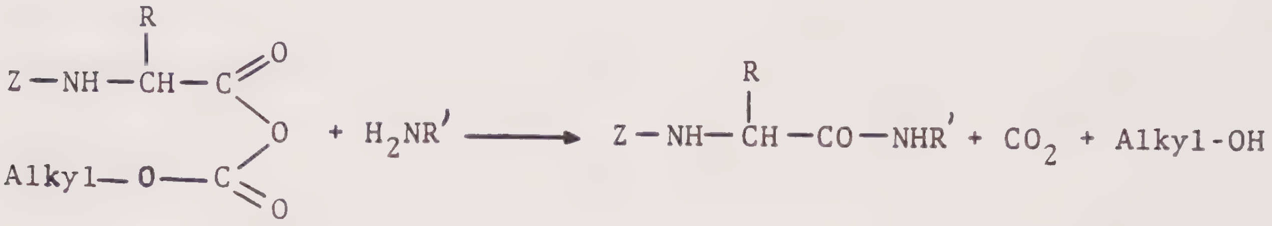


Schéma 5

L'isobutylchloroformiate ($(CH_3)_2CHO-COCl$) est d'après plusieurs auteurs / 2 / le meilleur réactif pour obtenir l'anhydride mixte et la N-Méthylmorpholine est la base la plus adaptée pour ce genre de réaction (pour minimiser la racémisation).

Cette première méthode a été mise en oeuvre dans les conditions suivantes :

16 mg de Pentagastrine (20,9 µmoles) ont été dissous dans 2 ml de Diméthylformamide, refroidis à -15°C par un mélange de carboglace et d'éthanol-méthanol (50-50), et additionnés de 21,9 µmoles d'isobutylchloroformiate en présence de 41,8 µmoles de N-Méthylmorpholine (NMM). Après 3 minutes on a ajouté goutte à goutte une solution de 3,8 mg d'Histamine (20,9 µmoles) dissous dans 275 µl de Diméthylformamide et 1 équivalent de NMM. On a incorporé au préalable à la solution d'Histamine 5 µCi d'Histamine ^{14}C (à 45,5 mCi/mmole) comme traceur. La pureté de l'Histamine ^{14}C a été contrôlée par CCM et radioenregistrement de la plaque (R_f = 0,08 dans un mélange Isopropanol/NH_4OH/H_2O : 100/5/10).

La réaction a été laissée sous agitation et suivie pendant 72 heures par chromatographie sur couche mince dans différents solvants (BAW-Ethylacétate : 30/70 ;100 /0) et radioenregistrement des plaques : le pic de radioactivité ^{14}C obtenu reste au niveau du dépôt sur les plaques et la comparaison avec les R_f, dans les mêmes solvants, de la Pentagastrine (0,7 ; 0,8) et de l'Histamine (0 ; 0) témoins montre que le couplage n'a pu être réalisé dans ces conditions.

L'addition, au cours de la réaction, de N-Méthylmorpholine pour faire varier le pH réactionnel entre 6 et 10 ne modifie pas les résultats obtenus.

Plusieurs facteurs importants influencent la formation de l'anhydride mixte et son couplage avec l'amine /2,3/, notamment la nature du composé acide,son encombrement stérique,la nature du composé aminé et du solvant, la température et le temps de réaction . Dans le cas présent la nature de l'acide (β-carboxylique) peut déjà nuire à un bon couplage par un anhydride mixte .

Pour obtenir le dérivé Pentagastrine-Histamine nous avons alors fait appel à une deuxième méthode de couplage qui utilise des carbodiimides.

III.2.2.1.2 - Mise au point du couplage par un carbodiimide

Les carbodiimides, de structure RN = C = NR', sont utilisés pour permettre l'activation des groupes carboxyliques par addition nucléophile et faciliter ainsi la fixation d'un groupement aminé (Schéma 6).

L'addition de l'acide et du carbodiimide conduit à la formation d'une o-acylisourée (I) instable qui réagit à son tour soit avec l'acide (réaction A) pour donner un anhydride symétrique de l'acide (II) et une urée, l'anhydride réagissant

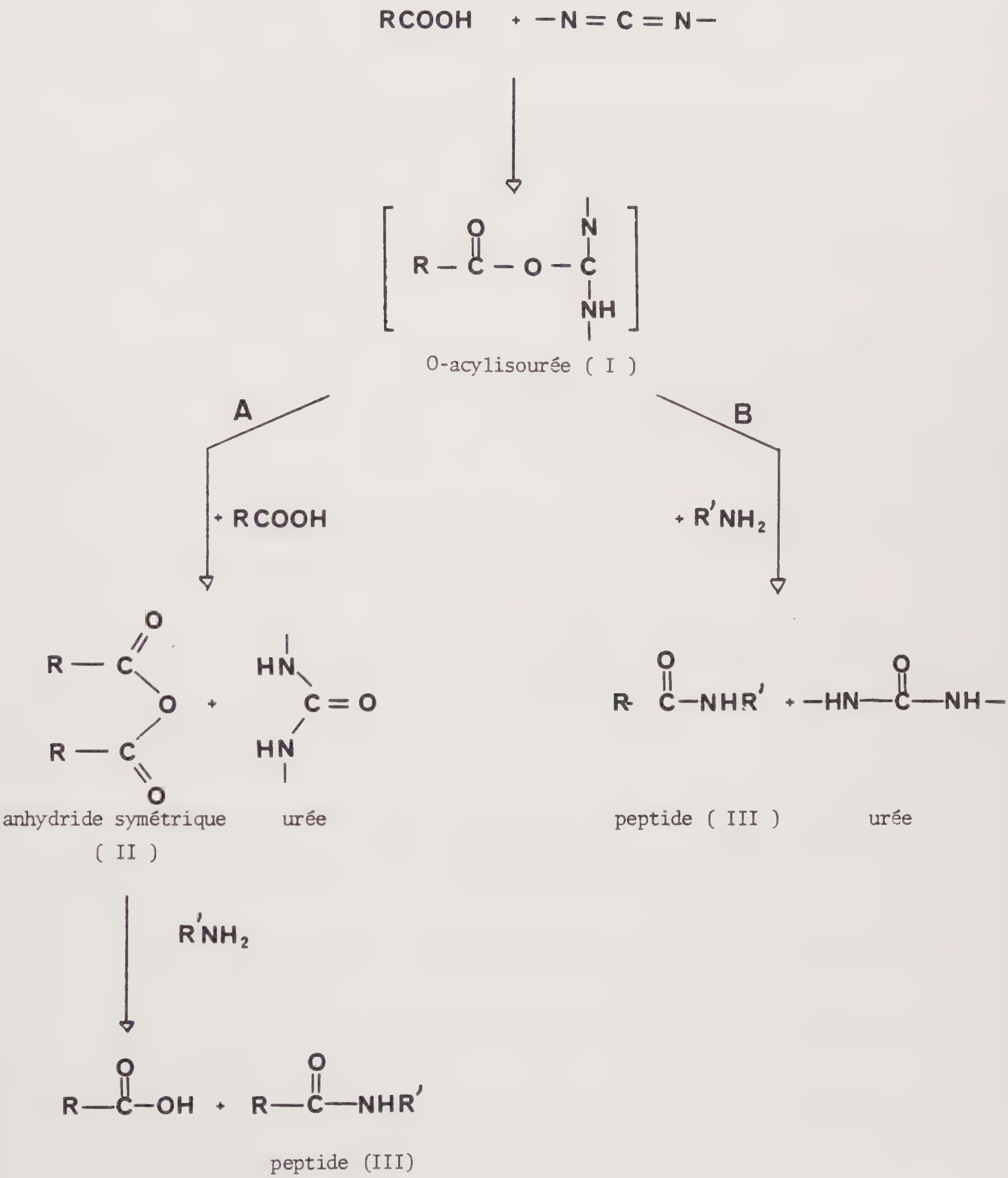

RCOOH + —N=C=N—
O-acylisourée (I)
A
B
+ RCOOH
+ R'NH2
anhydride symétrique
(II)
urée
peptide (III)
urée
R'NH2
peptide (III)

schéma 6

lui-même avec l'amine pour conduire à la formation du peptide recherché (III), soit avec l'amine (réaction B) pour donner directement le peptide et l'urée.

Cette méthode qui donne d'excellents résultats pour le couplage d'un groupement α-carboxyle et d'une α-amine primaire ou secondaire, est moins performante pour le couplage d'un β-carboxyle et nécessite souvent un excès de certains réactifs / 20 /.

Pour coupler l'Histamine au groupement β-carboxyle de la Pentagastrine, nous avons donc réalisé de nombreux essais en faisant varier les rapports des différents réactifs et le pH du milieu.

Selon le milieu réactionnel aqueux ou organique, différents carbodiimides peuvent être utilisés.

En solution aqueuse le 1-cyclohexyl-3(2-morpholinoéthyl) carbodiimide (ou CMC) est souvent employé tandis que le dicyclohexylcarbodiimide (ou DCC) est préférentiellement utilisé en milieu organique.

Dans notre étude la Pentagastrine étant solubilisée en milieu organique et l'Histamine en milieu aqueux, les deux carbodiimides CMC et DCC peuvent être utilisés.

Pour chaque essai nous avons suivi le même protocole :

1 - 1 mg (1,3 µmole) de Pentagastrine ou analogue dissous dans 200 µl de DMF.

2 - addition d'Histamine en solution aqueuse (+ 5 µCi Histamine ^{14}C).

3 - pH ajusté à la valeur choisie.

4 - addition du carbodiimide.

5 - volume total ajusté à 250 µl.

La température réactionnelle est maintenue à 0°C pendant 2 heures puis la réaction est poursuivie à température ambiante sous agitation magnétique.

Le mélange réactionnel est analysé dans chaque cas par chromatographie sur couche mince (CCM) ou par HPLC.

Les R_f des produits contrôlés dans ces essais par CCM dans différents solvants sont reportés dans le Tableau 4.

De même les temps de rétention obtenus par HPLC pour les différents composés sont donnés dans le Tableau 5.

Les différentes conditions expérimentales utilisées (pH réactionnel, rapports molaires de Pentagastrine, d'Histamine et de carbodiimide) sont reportées dans le tableau suivant :

Pentagastrine	Histamine	pH	Carbodiimide CMC
1	1	8 - 10	1 - 5 - 20
1	1	6	1 - 15
1	20	6	0,5 - 1 - 1,5 - 2 - 5 - 10 - 20
1	20	2 - 4 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10	20

Quelle que soit la quantité de carbodiimide CMC utilisée, en présence ou non d'un excès d'Histamine et quel que soit le pH réactionnel fixé, la quantité de dérivé Pentagastrine-Histamine (PG-Hist) formé est pratiquement nulle (moins de 5 %).

TABLEAU 4

R_f obtenus par chromatographies sur couches minces
sur plaques de Silicagel 60F-254 (Merck)

	BAW 80% EtoAc 20%	BAW 100%	PAW 37v EtoAc 60v
PG	0,83	0,84	0,31
Hist	0	0	0
Gly-NH_2	0,05	0,05	0,05
OHBT		0,75	
Boc-Gly-Leu-Asp-Phe-NH_2		0,82	
Boc-Trp-Leu-Asp-Gly-NH_2		0,80	
Boc-Trp-Leu-Asp-Phe-NH_2		0,89	
PG-Hist*	0,30	0,41	0,42
Pg-Gly NH_2		0,70	0,79
Boc-Gly-Leu-Asp(Hist*)-Phe NH_2		0,37	
Boc-Trp-Leu-Asp(Hist*)-Gly NH_2		0,34	
Boc-Trp-Leu-Asp(Hist*)-Phe NH_2		0,45	

L'Histamine et la Glycine amide sont révélées par la ninhydrine.

La Pentagastrine et les peptides contenant du Tryptophane sont révélés par le réactif d'Ehrlich, et les autres par le TMD.

L'Histamine ^{14}C(*) incorporée permet également de repérer les composés qui en contiennent par radioenregistrement des plaques chromatographiques.

TABLEAU 5

Temps de rétention des différents composés obtenus par chromatographie HPLC sur une colonne analytique de Partisil 10-ODS-2 (L = 250 mm, Ø = 4,5 mm), avec un débit d'élution de 1,2 ml/mn, l'absorption optique étant suivie à λ = 280 nm ou à λ = 215 nm (*)

	Programme d'élution		
	P.14	P.15	P.16
PG	17,03	15,7	15,85
Hist		2,86*	
OHBT	6,76	5,40	2,90
OHSu		2,86	
PCPOH			6,10
PGAsu	19,00	17,28	20,36
PG ox	15,32		
PG-Gly NH_2	15,46		
PG-Hist	14,70	14,01	20,78
Boc-Trp-Leu-Asp-Gly NH_2		14,70	
Boc-Trp-Leu-Asp(Hist)-Gly NH_2		13,10	
Boc-Trp-Leu-Asp-Phe NH_2		16,86	
Boc-Trp-Leu-Asp(Hist)-Phe NH_2		14,50	
Boc-Gly-Leu-Asp-Phe NH_2		15,40*	
Boc-Gly-Leu-Asp(Hist)-Phe NH_2		13,75*	

TABLEAU 5 (suite)

Les programmes P.14 et P.15 donnent les gradients d'élution décrits ci-dessous en utilisant comme solvants A et B :

	ACN	/	TEAP 0,1 M pH 3,5
A :	20	/	80
B :	80	/	20

P.14

temps mn	% A	% B
0	100	0
3	100	0
23	0	100
26	0	100

P.15

temps mn	% A	% B
0	100	0
3	100	0
19	0	100
29	0	100

Le programme P.16 utilise comme solvants A et B :

	ACN	/	$AcNH_4$ 0,01 M pH 4,7
A :	20	/	80
B :	80	/	20

P.16

temps mn	% A	% B
0	100	0
3	100	0
23	0	100
28	0	100

Par contre, on observe au cours du temps la formation d'(Aminosuccinyl[4])-Pentagastrine ou PGAsu. La figure 23 montre la cinétique de formation de PGAsu lorsque la Pentagastrine est en présence de 1 équivalent d'Histamine et de 15 équivalents de carbodiimide CMC à pH 6.

III.2.2.1.2.1 - Catalyse du couplage par le 1-hydroxybenzotriazole (OHBT)

La cyclisation de l'acide aspartique de la Pentagastrine, qui se réalise aux dépens du dérivé recherché a pu être évitée grâce à l'utilisation d'un catalyseur du couplage, le 1-hydroxybenzotriazole (OHBT) ou l'hydroxysuccinimide (OHSu) / 63 /.

En effet, ces deux produits peuvent faciliter le couplage par le carbodiimide en limitant certaines réactions secondaires, comme par exemple celle de la transposition de l'espèce réactive o-acylisourée (Schéma 7).

O-acylisourée N-acylurée

Schéma 7

La N-acylurée ainsi formée est beaucoup moins réactive et diminue donc le rendement du couplage. Ce problème peut être limité par la présence d'un nucléophile qui réagit très rapidement avec l'o-acylisourée pour donner un agent acylant

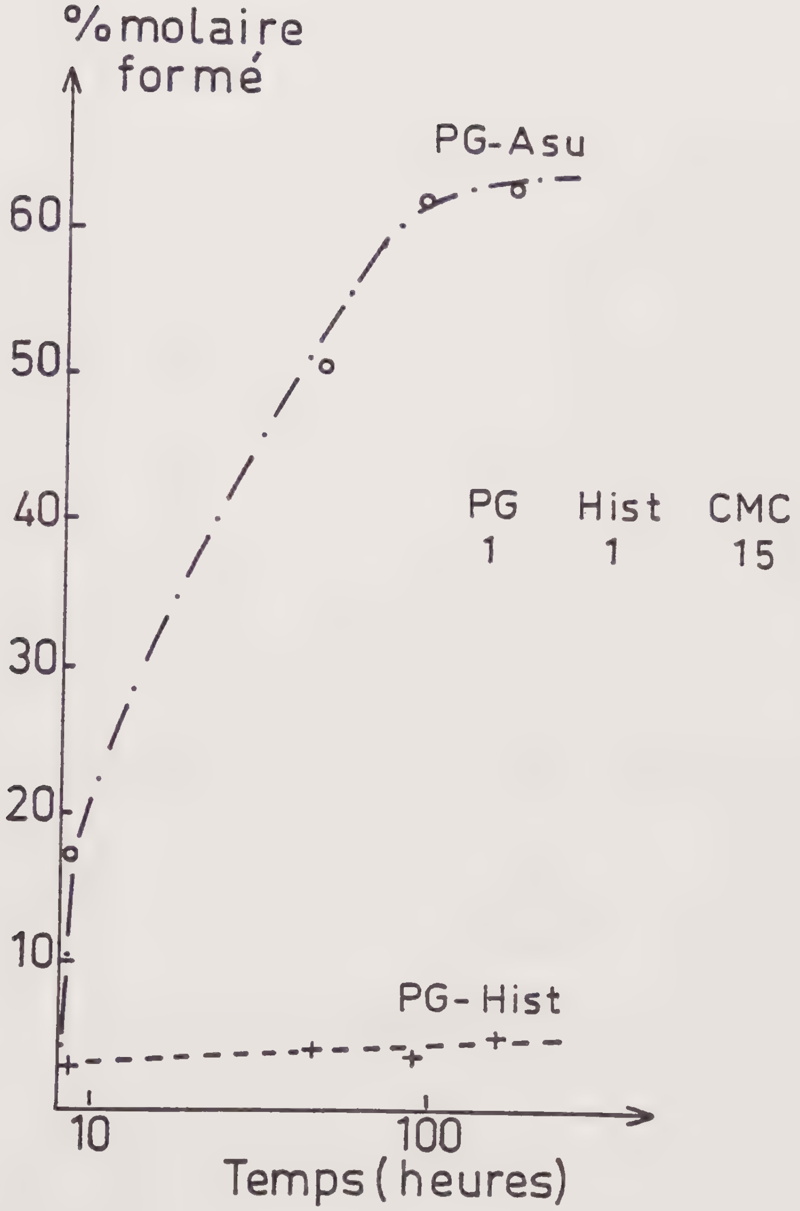
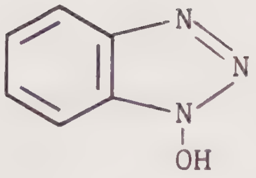


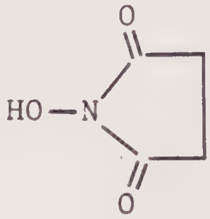
Figure 23 - Cinétiques de formation des dérivés Pentagastrine-Histamine (+------+) et PGAsu (o—·—o) en présence de CMC à pH 6.

encore suffisamment réactif pour l'aminolyse. Les nucléophiles pouvant jouer ce rôle sont par exemple le 1-hydroxybenzotriazole (A) et l'hydroxysuccinimide (B) (Schéma 8) / 88, 86, 52 /.



OHBT

A



OHSu

B

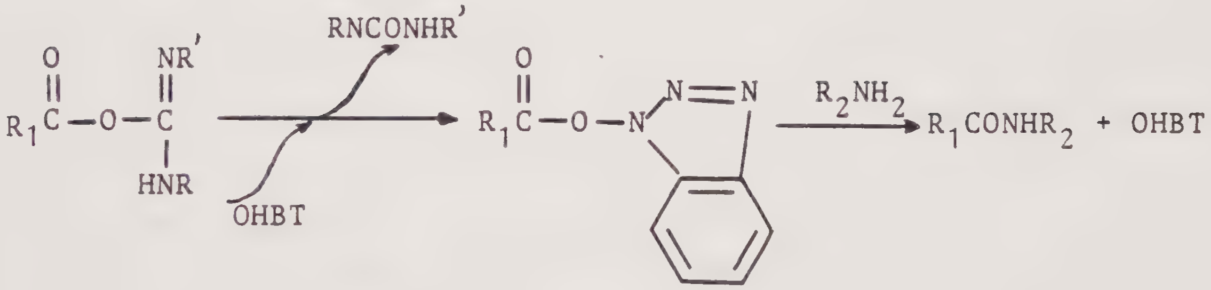


Schéma 8

L'activation du couplage de l'o-acylisourée à l'amine primaire de l'Histamine par l'OHBT (réaction rapide) permet ainsi de limiter la réaction de cette o-acylisourée avec l'amine secondaire peptidique de la Phénylalanine, moins réactive, qui conduit à la formation du dérivé Asu.

Ainsi en présence de deux équivalents de 1-cyclohexyl-3 (2-morpholinoéthyl)-carbodiimide (CMC) et de 1,1 équivalent d'OHBT, la Pentagastrine et l'Histamine équimolaires ont pu être

couplées avec un rendement allant jusqu'à 70 % en limitant la formation de PGAsu (figure 24).

La nécessité du catalyseur OHBT a également été montrée dans le cas du couplage de la Pentagastrine (1,1 µmole) avec un résidu Glycine amide (1 éq.) par le CMC (2 éq.) (figure 25).

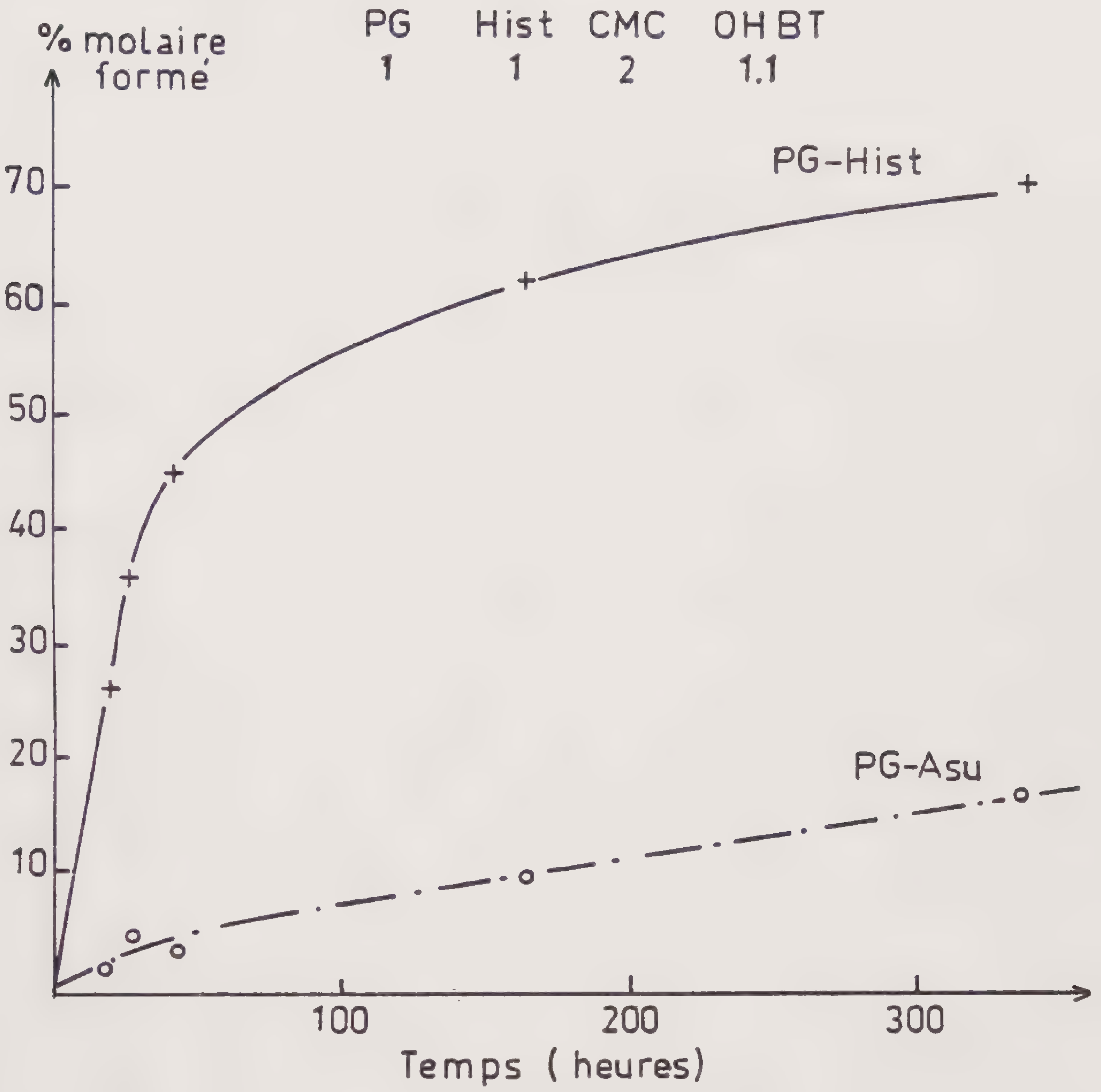
De même trois tétrapeptides, analogues de la Tétragastrine, et contenant également un résidu aspartyle, Boc-Trp-Leu-Asp-Gly-NH_2, Boc-Gly-Leu-Asp-Phe NH_2 et Boc-Trp-Leu-Asp-Phe NH_2, ont pu être couplés à l'Histamine par deux équivalents de CMC et 1,2 équivalent de OHBT à pH 6 avec des rendements respectifs de 40 %, 43 % et 63 % après 20 h, 22 h et 46 h.

III.2.2.1.2.2 - Comparaison des catalyseurs OHBT et OHSu

Les pouvoirs catalytiques du 1-hydroxybenzotriazole (OHBT) et de l'hydroxysuccinimide (OHSu) ont été comparés dans le couplage de 1 µmole de Pentagastrine à 1 équivalent d'Histamine avec 2,5 équivalents de DCC, en présence de 1,2 équivalent de l'un ou l'autre de ces catalyseurs, dans un mélange DMF-H_2O (50-50) à pH 6 (400 µl). Nous avons obtenu un rendement de couplage dans un tel milieu à peu près identique avec les deux catalyseurs. L'OHBT, étant plus soluble en milieu organique, sera utilisé préférentiellement lorsque le DMF est majoritaire dans le solvant réactionnel. Inversement en milieu plutôt aqueux l'utilisation de OHSu est préférable.

III.2.2.1.2.3 - Comparaison du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et du 1-cyclohexyl-3 (2-morpholinoéthyl)-carbodiimide (CMC)

Nous avons comparé les cinétiques et les rendements de couplage de ces deux carbodiimides dans la condensation de la Pentagastrine et de l'Histamine (équimolaires), en présence de 1.1 équivalent de OHBT à pH 6.



<u>Figure 24</u> - Cinétiques de formation des dérivés Pentagastrine-Histamine (+——+) et PGAsu (o—·—o) en présence de CMC et de OHBT à pH 6.

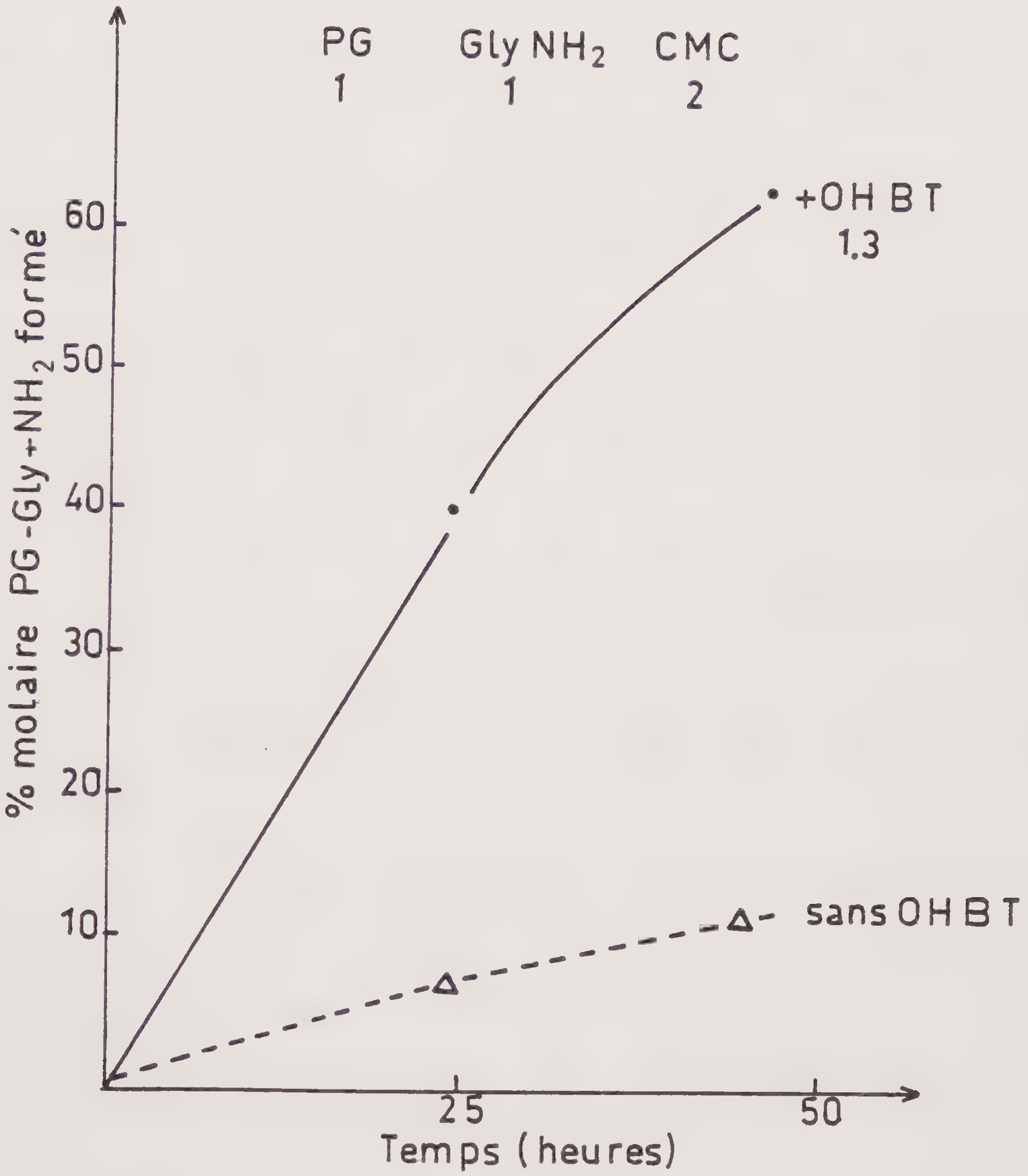


Figure 25 - Cinétiques de formation du dérivé PG-GlyNH_2 en présence de CMC, avec (• —— •) ou sans (Δ --- Δ) OHBT.

La figure 26 montre les cinétiques obtenues dans les deux cas.

Le pourcentage de PG-Hist formée atteint son maximum (80 %) en 24 heures avec le DCC alors que la synthèse du dérivé est moins rapide avec le CMC.

Il est donc préférable d'utiliser le DCC comme carbodiimide dans le cas de notre couplage.

La meilleure combinaison carbodiimide-catalyseur semble donc être DCC-OHBT pour le couplage de la Pentagastrine à l'Histamine et les meilleurs rapports molaires de ces quatre produits sont : PG/Hist/OHBT/DCC : 1/1/1.2/2.

III.2.2.1.3 - Couplage de l'Histamine à la Pentagastrine en présence de DCC et d'OHBT

Nous avons donc appliqué les meilleures conditions trouvées à la synthèse d'une quantité importante de Pentagastrine-Histamine.

protocole :

A 129 µmoles de Pentagastrine (99 mg) dissoutes dans 500 µl de Diméthylformamide (DMF) on ajoute 130 µmoles d'Histamine (24,3 mg, 1 équ. PG) dissoutes dans 100 µl H_2O contenant 180 µCi d'Histamine ^{14}C. 164 µmoles (21,57 mg, 1,2 eq. PG) de 1-hydroxybenzotriazole dans 100 µl DMF puis 265 µmoles (54,7 mg, 2 éq. PG) de dicyclohexylcarbodiimide dans 500 µl DMF sont ensuite additionnées. Le pH est ajusté par de la triéthylamine à pH6 La solution est maintenue à 0°C pendant 1 heure puis la réaction est poursuivie à température ambiante.

L'avancement de la réaction est suivi analytiquement à 280 nm par HPLC Partisil10 ODS 2 (programme P 15) (figure 27). La réaction est terminée après 40 h environ. La dicyclohexylurée est alors filtrée (sur Millipore LS 5 µm) et la Pentagastrine-Histamine est purifiée sur une colonne de Silice 60 (L = 28 cm,

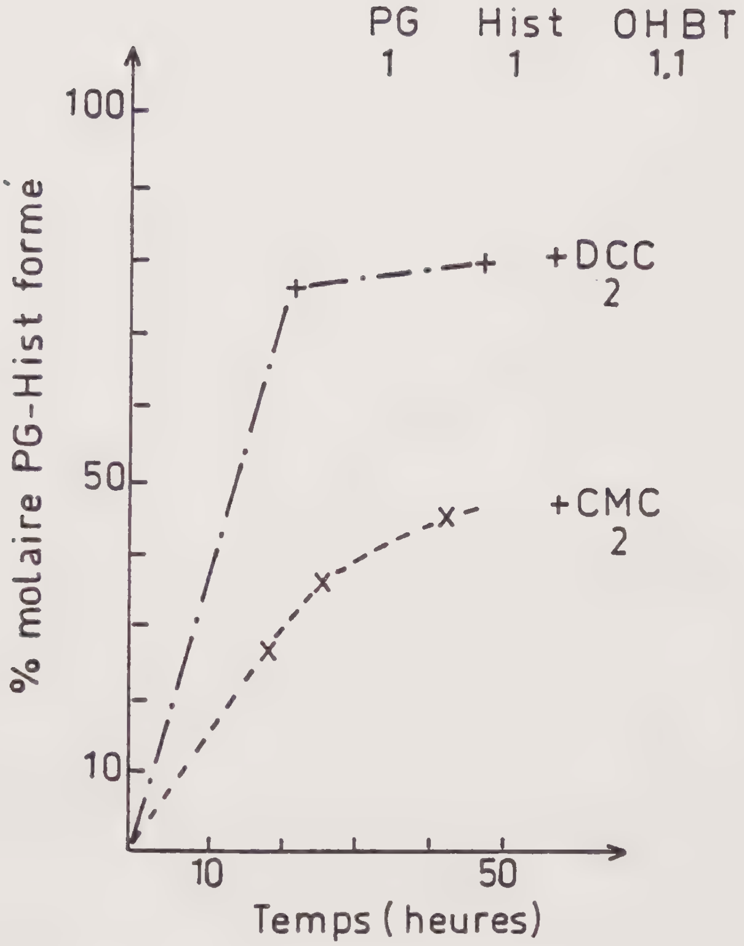
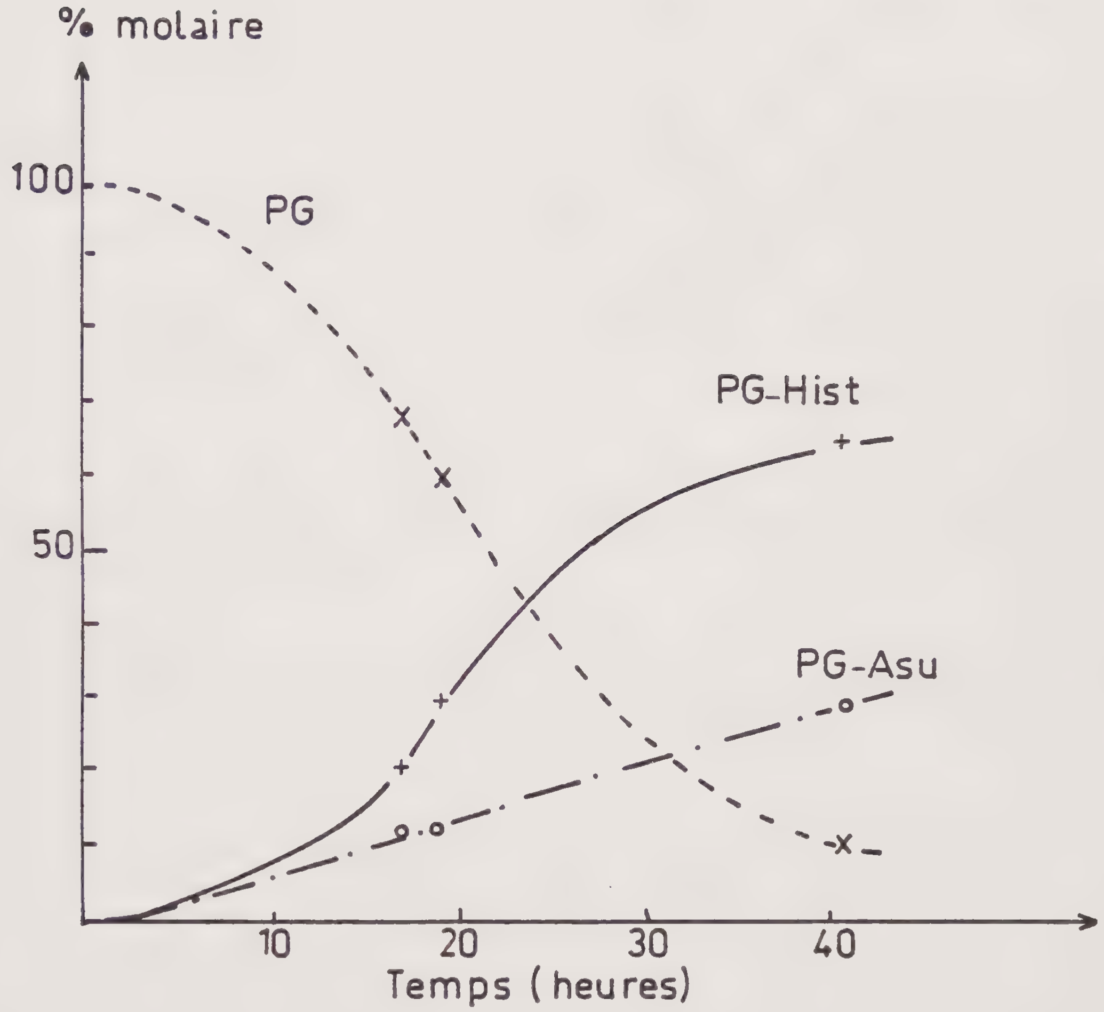


Figure 26 - Cinétiques de formation du dérivé Pentagastrine-Histamine en présence de OHBT et de DCC (+ —·—·+) ou de CMC (x --- x).



<u>Figure 27</u> - Cinétiques de formation des dérivés Pentagastrine-Histamine (+——+) et PGAsu (o—·—o) et de transformation de la Pentagastrine (x --- x) dans les conditions PG-Hist-OHBT-DCC = 1-1-1.2-2 .
(PG) = 100 mg/0.5 ml.

Ø = 2,3 cm). Un gradient d'EtoAc/B.A.W. de (100/0) à(0/100) (débit 4 ml/mn) a permis d'éluer successivement le 1-hydroxy-benzotriazole en excès, la PGAsu formée, la Pentagastrine qui n'a pas réagi puis le dérivé PG-Hist ^{14}C (à environ 60 % B.A.W.), chaque pic d'élution étant analysé par HPLC, comptage de la radioactivité ^{14}C et spectre d'absorption. La PG-Hist ^{14}C ainsi obtenue n'étant pas parfaitement pure (d'après CCM et HPLC) une deuxième purification a été réalisée sur colonne LH 20 (L = 40 cm, Ø = 2,5 cm) avec comme éluant le mélange Acide acétique/Méthanol/Eau (1/1/1) (débit : 0,5 mL/mn). La Pentagastrine-Histamine est éluée avec V_{el} = 100 ml de solvant.

Sa pureté a été vérifiée par HPLC (figure 28), chromatographie sur couche mince et radioenregistrement (figure 29), et spectre (figure 30).

Nous avons ainsi obtenu 39,2 mg (45,5 µmoles) de Pentagastrine-Histamine ^{14}C pure, soit un rendement global de 35,2 % après purification.

III.2.2.2 - Etude conformationnelle par dichroïsme circulaire

Nous avons comparé les spectres du dichroïsme circulaire de la Pentagastrine et de la Pentagastrine-Histamine en solution dans le Trifluoroéthanol (figure 31).

L'intensité supérieure des signaux dichroïques du dérivé Pentagastrine-Histamine dans la région aromatique suggère une rigidité plus importante du Tryptophane. Dans l'U.V. lointain l'amplitude de la bande positive centrée vers 193 nm (contribution des transitions π-π^* des liaison peptidiques et de la Phénylalanine) est légèrement supérieure dans le cas du dérivé Histaminique mais vers 200-220 nm l'ellipticité de ce dérivé est plus faible.

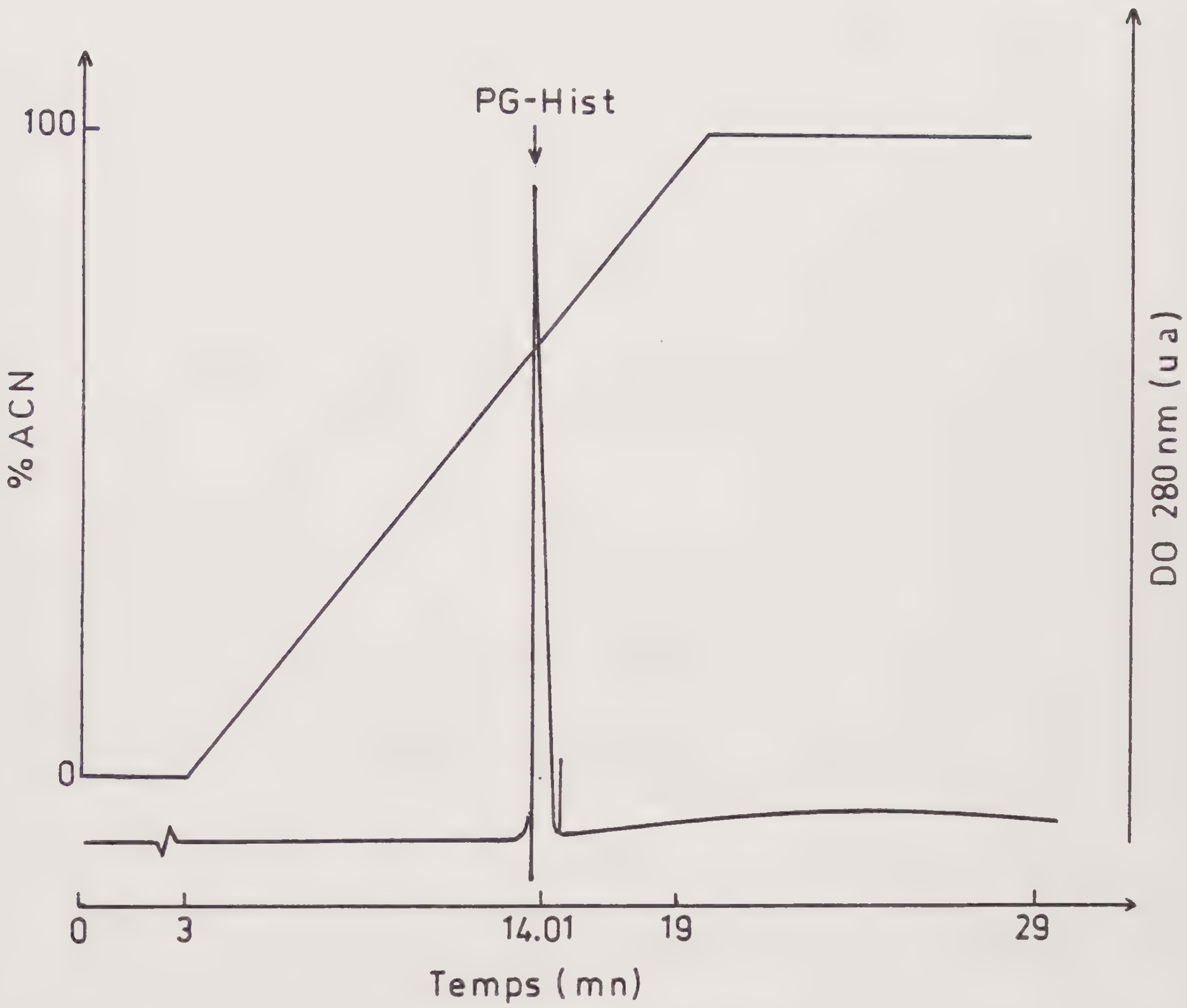
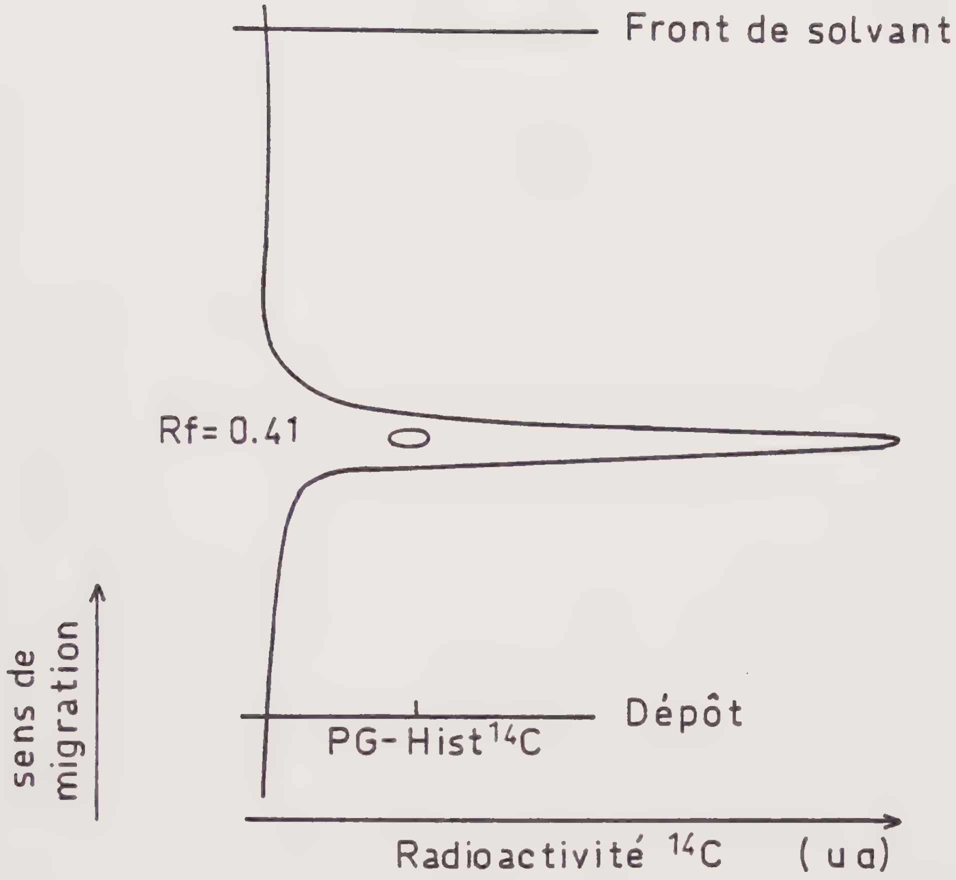


Figure 28 - Profil d'élution sur HPLC analytique Partisil 10-ODS-2 (programme P.15) de la Pentagastrine-Histamine purifiée. Gradient d'élution : 0 à 100% d'acétonitrile dans un tampon triéthylamine phosphate 0.1 M pH 3.5.



<u>Figure 29</u> - Contrôle de pureté de la Pentagastrine-Histamine par chromatographie sur couche mince de silice et mesure de la radioactivité ^{14}C.
Eluant : butanol/acide acétique/eau : 75/10/20
Révèlateur : TMD

Figure 30 - Spectre d'absorption de la Pentagastrine-Histamine.

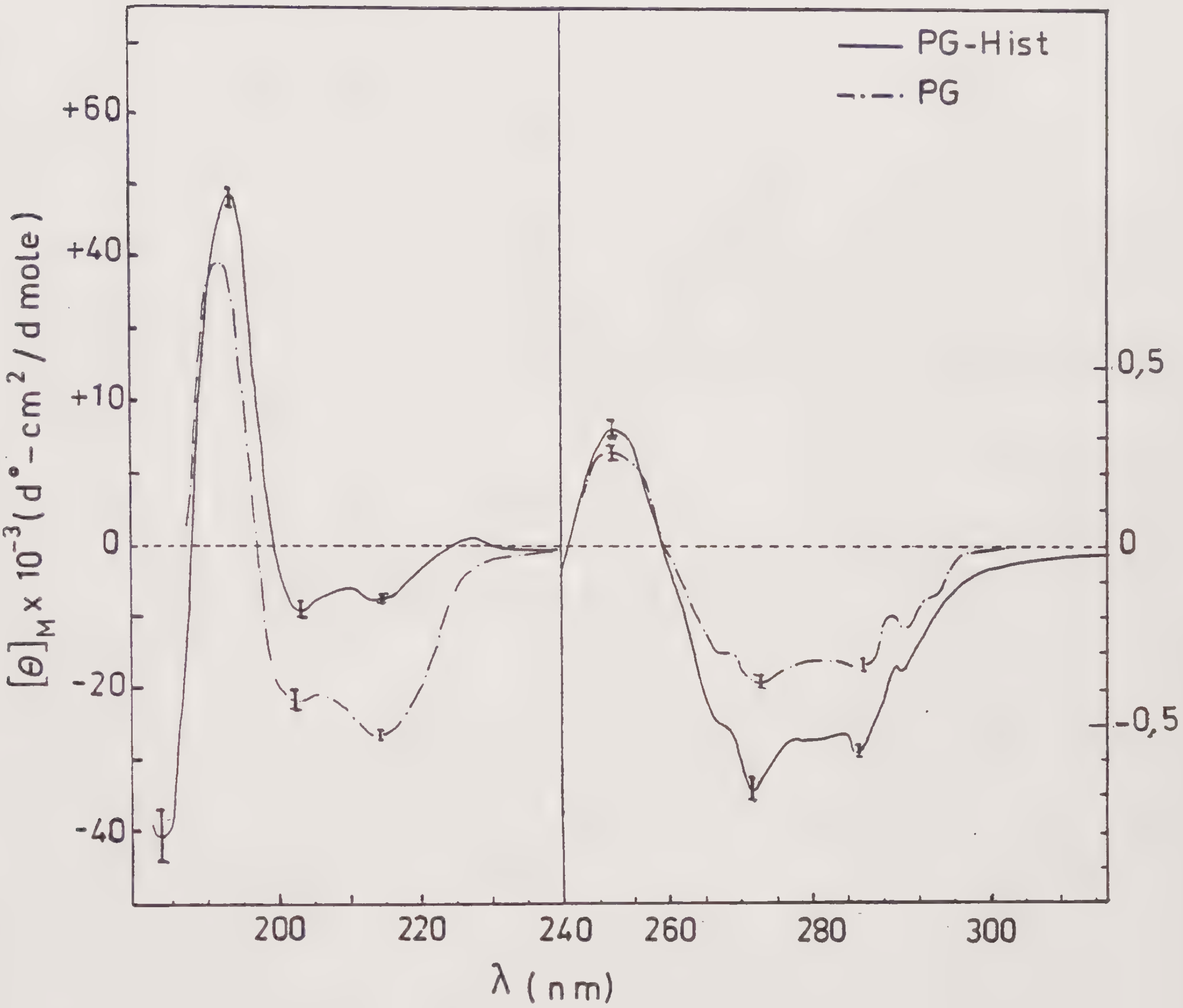


Figure 31 - Spectres de dichroïsme circulaire de la Pentagastrine-Histamine (——) et de la Pentagastrine (—·—) dans le trifluoroéthanol.

Qualitativement l'allure générale des deux spectres est peu différente, ce qui reflète une similitude de conformation globale des deux peptides. C'est un résultat, à première vue, en accord avec ce que l'analyse du modèle moléculaire permettait de prévoir, comme il a été indiqué au début de ce chapitre. Il reste à établir, par un examen des propriétés biologiques du peptide que la présence de l'Histamine permet toujours la fixation du dérivé de l'hormone à son récepteur et quelle conséquence en résulte.

III.2.2.3 - Activité biologique

Nous avons étudié l'activité biologique du dérivé Pentagastrine-Histamine sous deux angles :

1) vérifier que ce dérivé ne possède pas de pouvoir agoniste puisque le groupe carboxylique de l'acide aspartique de la Pentagastrine est substitué et que, à ce jour, toute substitution à ce niveau s'est révélée empêcher le déclenchement de l'activité biologique.

2) rechercher un effet antagoniste de ce composé soit vis-à-vis de la Pentagastrine soit vis-à-vis de l'Histamine, ce dérivé pouvant être considéré comme un dérivé de l'une ou l'autre de ces molécules, effet qui traduirait son aptitude à se fixer au récepteur de la molécule parentale considérée.

III.2.2.3.1 - Recherche d'un effet agoniste

Une courbe dose-réponse a été établie par injections uniques du dérivé Pentagastrine-Histamine à différentes doses (jusqu'à 62,4 nmoles/kg) et comparée à celle obtenue par la Pentagastrine dans la même gamme de concentration (figure 32).

Aux doses de dérivé utilisées aucun effet agoniste n'a pu être observé, ce qui confirme bien l'hypothèse émise.

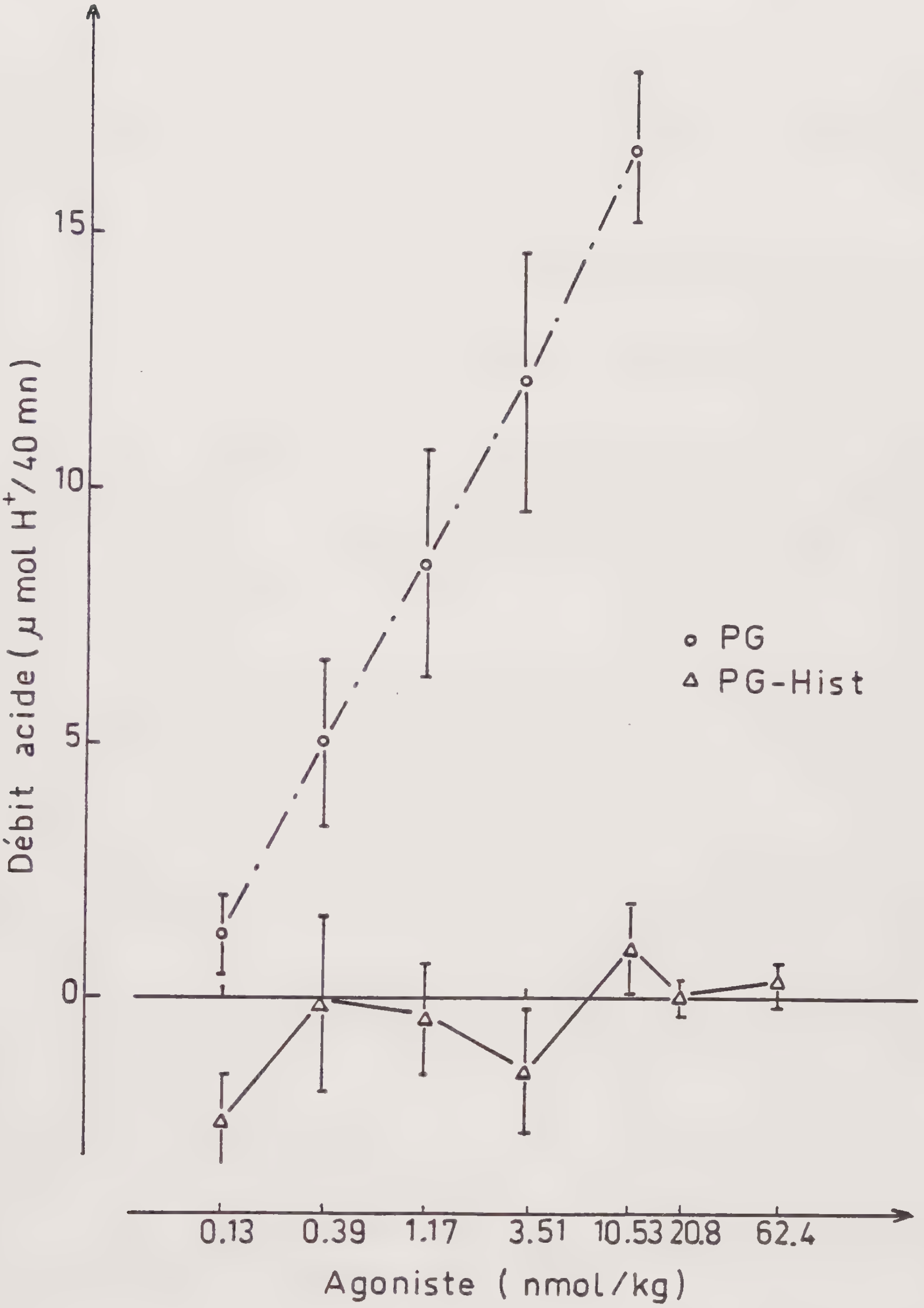


Figure 32 - Courbes dose-réponse de la Pentagastrine-Histamine (Δ) et de la Pentagastrine (o).

De plus, ce résultat montre que la liaison amide entre Pentagastrine et Histamine n'est pas coupée in vivo puisque l'on observerait alors l'activité agoniste de la Pentagastrine libérée.

III.2.2.3.1 - Recherche d'un effet antagoniste

III.2.2.3.1.1 - Vis-à-vis de la Pentagastrine

Pour bénéficier de l'avantage que représente une concentration constante de stimulant au niveau du récepteur nous avons préféré étudier le pouvoir antagoniste du dérivé sur des plateaux de secrétion de Pentagastrine perfusée plutôt que par des injections uniques.

Ces différents plateaux ont été obtenus par perfusion de Pentagastrine aux doses 0,16 nmole/kg/h, 1,3 nmole/kg/h, 5,2 nmoles/kg/h.

Une fois le plateau de secrétion stimulée obtenu, le dérivé Pentagastrine-Histamine a été injecté à différentes doses (0,16 - 0,64 - 1,3 - 5,2 ou 20,8 nmoles/kg) selon les plateaux.

La variation de secrétion est suivie pendant une durée supérieure à 2 heures dans tous les cas.

- *Expression des résultats*

Pour chaque dose nous avons retenu entre 5 et 11 valeurs significatives de réponses secrétoires.

Les résultats sont exprimés de deux manières complémentaires :

. Courbes moyennes d'inhibition :

Chaque valeur représente la moyenne ($\pm$ ESM), par fraction de 20 minutes, des réponses obtenues sur chaque groupe

d'essais. Ces courbes permettent de visualiser l'évolution de l'inhibition dans le temps.

. Moyennes des inhibitions maximales :

Chaque valeur est calculée par la moyenne des pourcentages d'inhibition maximale obtenue pendant l'heure qui suit l'injection, par rapport à la secrétion du plateau de Pentagastrine considéré. Ces données reflètent l'intensité de l'inhibition observée.

La figure 33 montre les courbes moyennes d'inhibition obtenues sur les trois plateaux de secrétion de Pentagastrine par l'injection de différentes doses du dérivé PG-Hist, en fonction du temps.

Le Tableau 6 donne les moyennes des inhibitions maximales pour chaque cas (sur n essais).

- *Résultats*

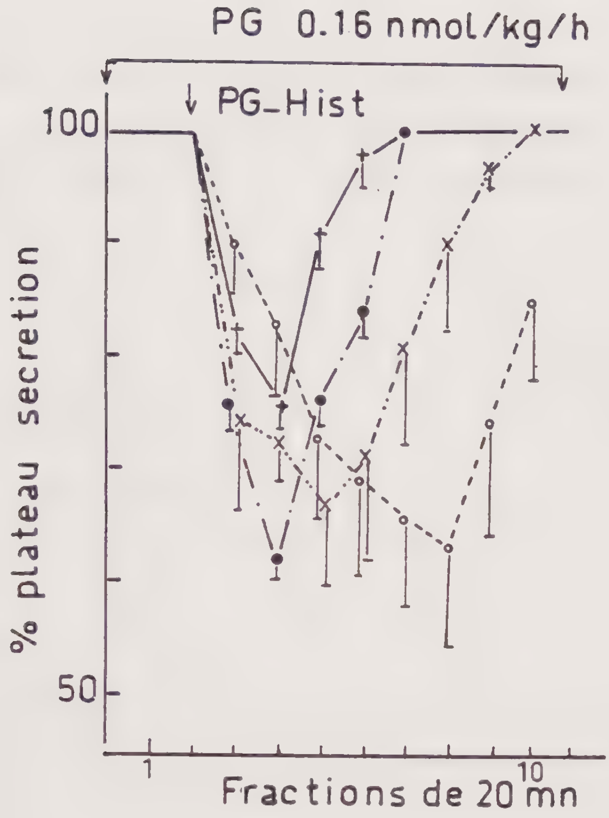
A l'examen des résultats obtenus on observe que :

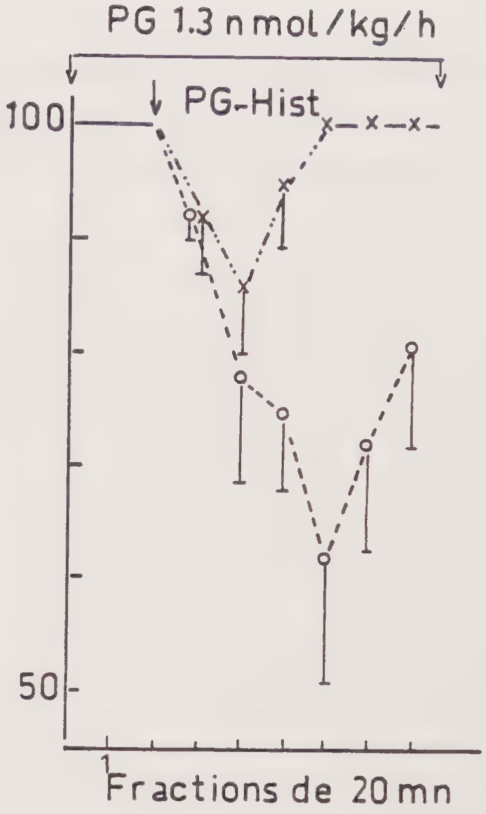
* Premièrement, il y a, quelle que soit la dose et quel que soit le rapport molaire étudié, inhibition significative du plateau de secrétion.

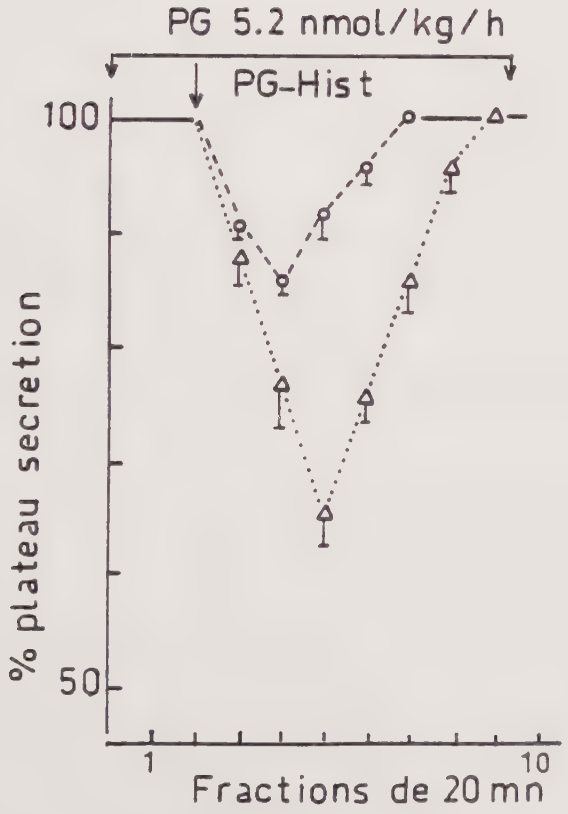
Le dérivé PG-Histamine est donc antagoniste de la Pentagastrine.

* Deuxièmement :

- Lorsque Pentagastrine-Histamine et Pentagastrine sont administrées dans un rapport 1/1, l'inhibition maximale du plateau de secrétion de Pentagastrine varie de 15 à 25 % et cette inhibition dure environ 1 heure 20 mn.







<u>Figure 33</u> - Courbes moyennes d'inhibition des plateaux de sécrétion stimulés par perfusion de PG à 0.16, 1.3 ou 5.2 nmol/kg/h par injection de Pentagastrine-Histamine aux doses de :

0.16 nmol/kg (+ —— +)
0.64 nmol/kg (● —·— ●)
1.3 nmol/kg (x -··-- x)
5.2 nmol/kg (o ---- o)
20.8 nmol/kg (Δ ······· Δ)

TABLEAU 6

Moyennes (± ESM) des pourcentages d'inhibition maximale obtenue sur des groupes de n rats par injection de Pentagastrine-Histamine sur différents plateaux de secrétion de Pentagastrine

Doses de PG-Histamine injectées	Doses de Pentagastrine (nmoles/kg/h) en plateaux de secrétion		
nmoles/kg	0,16	1,3	5,2
0,16	25,2 ± 2,3 % n = 6		
0,64	38,0 ± 1,7 % n = 6		
1,3	33,6 ± 7,6 % n = 5	15,2 ± 6,3 % n = 7	
5,2	32,3 ± 7,8 % n = 11	46,0 ± 9,0 % n = 5	14,1 ± 1,2 % n = 6
20,8			35,2 ± 3,0 % n = 9

- Lorsque ces deux composés sont dans un rapport 4 (PG-Hist)/1 (PG) l'inhibition maximale du plateau de Pentagastrine atteint 35 à 45 % et la durée de l'inhibition est alors augmentée à environ 2 heures.

- Lorsque le rapport PG-Hist/PG est porté à 8 ou davantage l'inhibition maximale n'est plus augmentée ainsi que le montrent les essais réalisés sur un plateau de Pentagastrine à 0,16 nmole/kg/h.

  L'antagonisme de la Pentagastrine-Histamine vis-à-vis de la Pentagastrine n'est donc pas total.

* Troisièmement :

Sur la figure correspondant au plateau de Pentagastrine à 0,16 nmole/kg/h les aires d'inhibition, qui peuvent donner une expression de l' "intensité-durée" de l'effet observé, augmentent dans les rapports 1, 1.6, 2.3, 3.2 lorsque l'on injecte des doses croissantes de PG-Histamine, respectivement 0,16 , 0.64 , 1.3 et 5.2 nmoles/kg.

Donc bien que l'antagonisme du dérivé vis-à-vis de la Pentagastrine ne soit que partiel, on peut obtenir une durée de l'effet plus importante en augmentant le rapport antagoniste/agoniste.

III.2.2.3.2.2 - Vis-à-vis de l'Histamine

Dans le modèle expérimental de rat anesthésié, une réponse secrétoire similaire nécessite des doses 1.000 fois plus importantes d'Histamine que de Pentagastrine (figures 32 et 34).

Pour étudier le pouvoir antagoniste du dérivé Pentagastrine-Histamine vis-à-vis de l'Histamine, nous avons donc comparé l'effet obtenu par l'injection de ce dérivé sur un

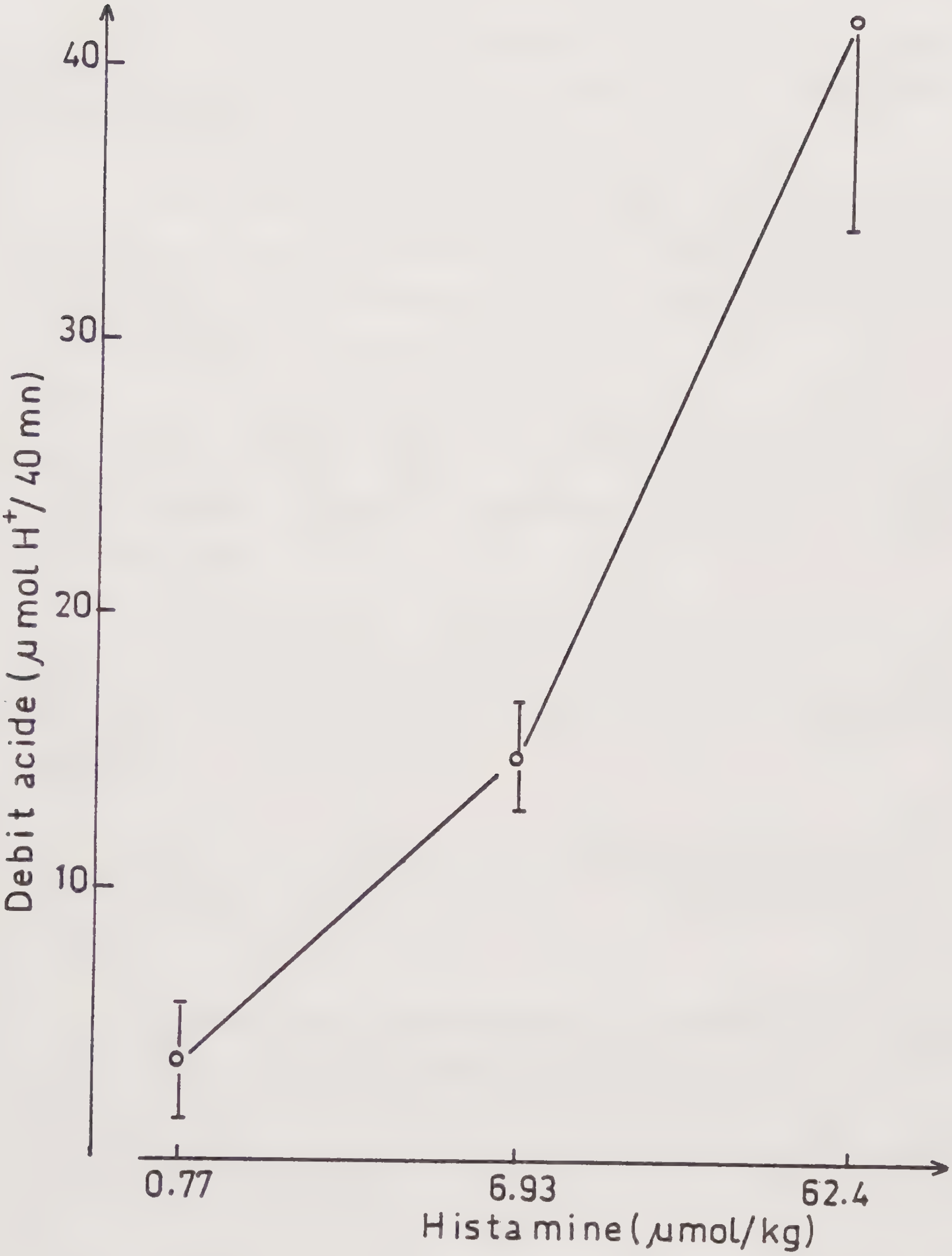


Figure 34 - Courbe dose-réponse de l'Histamine.

plateau de secrétion d'Histamine avec celui donné dans les mêmes conditions par un antihistaminique H_2 bien connu : la Cimétidine.

Sur un plateau d'Histamine perfusée à 13,5 µmoles/kg/h nous avons étudié la variation de secrétion produite par l'injection de 150 nmoles/kg soit de Cimétidine, soit de Pentagastrine-Histamine.

Les courbes moyennes d'inhibition obtenues sur quatre essais par les deux composés sont représentées sur la figure 35, et le Tableau 7 donne les moyennes d'inhibition maximale atteintes dans les deux cas.

On observe que l'injection d'une même dose de Cimétidine ou de la Pentagastine-Histamine entraîne une inhibition très voisine de la réponse à l'Histamine, tant en durée qu'en intensité.

A la dose étudiée, la Pentagastrine-Histamine semble donc avoir un pouvoir antagoniste de l'Histamine comparable à celui de la Cimétidine.

La Pentagastrine-Histamine injectée dans un rapport 1/100 de la dose d'Histamine perfusée permet une inhibition de 56 % de la réponse du plateau alors qu'il est nécessaire de l'administrer à une dose au moins 4 fois supérieure à la Pentagastrine pour en obtenir une inhibition de 45 %.

La durée de l'inhibition par la PG-Histamine de la secrétion provoquée par l'Histamine (environ 3 heures) est semblables à celle que peut produire dans les conditions appropriées ce dérivé sur la secrétion stimulée par la Pentagastrine.

La similitude des effets produits par la Cimétidine et la Pentagastrine-Histamine sur la réponse secrétoire à l'Histamine conduit à comparer les structures de ces deux composés :

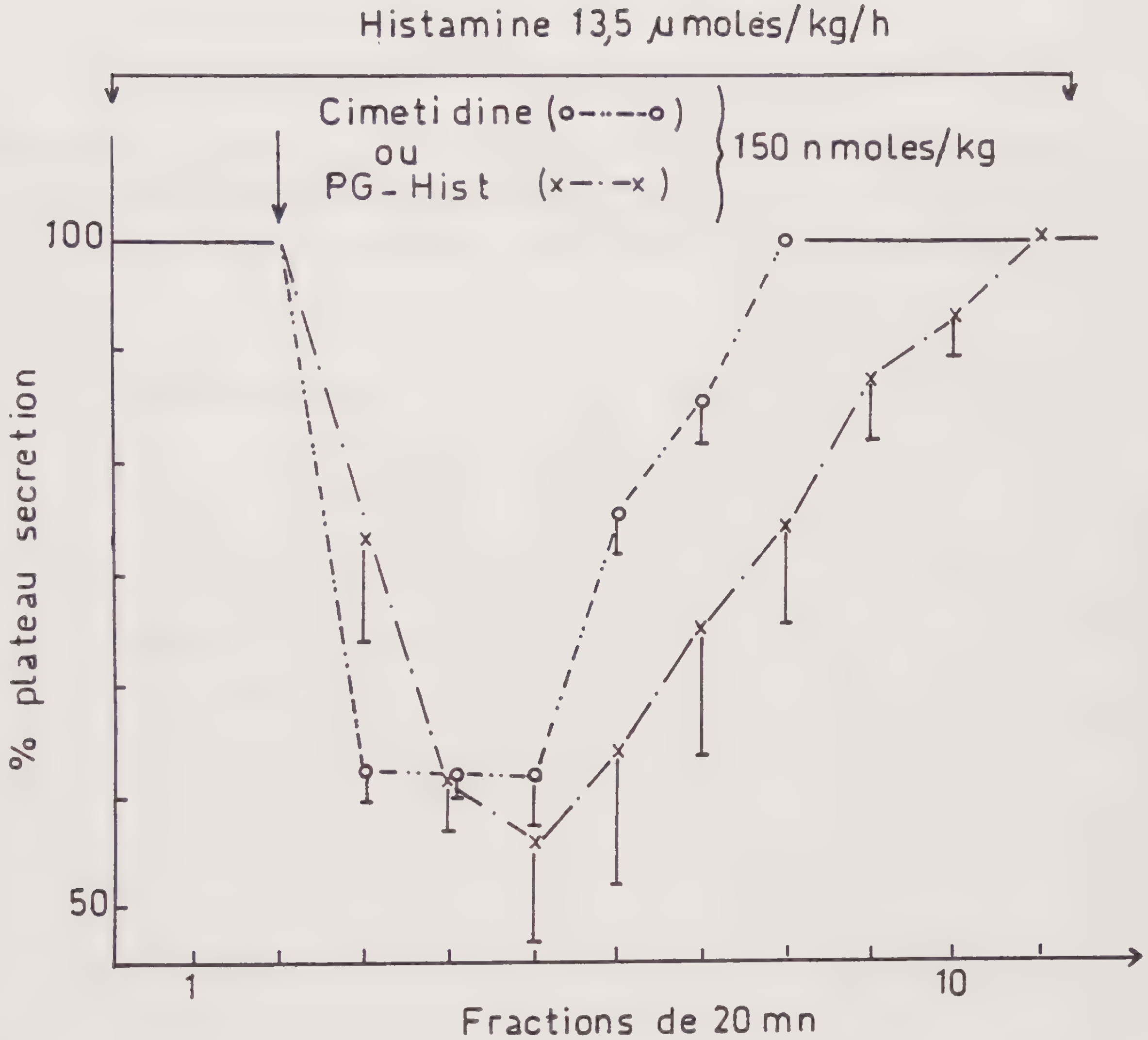


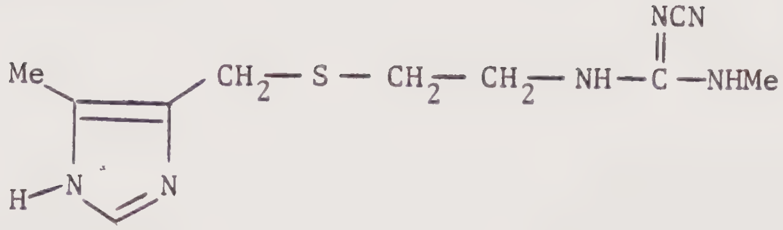
Figure 35 - Courbes moyennes d'inhibition du plateau de sécrétion stimulé par l'Histamine perfusée à 13,5 µmoles/kg/h par l'injection à 150 nmoles/kg de Pentagastrine-Histamine (x—·—x) ou de Cimétidine (o-·-·-o).

TABLEAU 7

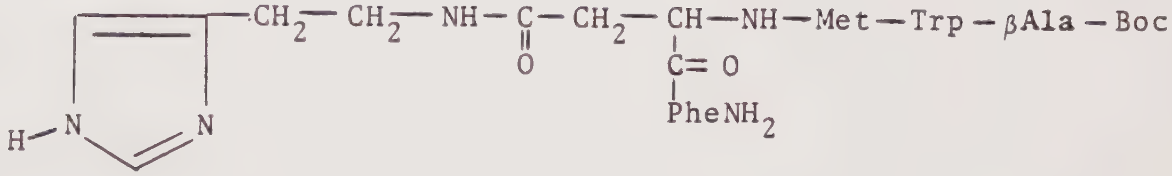
Moyennes (± ESM) des pourcentages d'inhibition maximale obtenue par injection de Pentagastrine-Histamine ou de Cimétidine sur un plateau de secrétion d'Histamine

Plateau de secrétion Histamine 13,5 µmoles/kg/h	
Pentagastrine-Histamine 150 nmoles/kg	Cimétidine 150 nmoles/kg
56,5 ± 7,2 % n = 4	54,4 ± 2,7 % n = 4

Cimétidine



Pentagastrine-Histamine



Cimétidine et PG-Histamine conservent toutes deux le noyau imidazole de l'Histamine. Bien que celui-ci n'apparaisse plus comme indispensable aux antihistaminiques H_2 / 15 / comme nous l'avons déjà rappelé, son encombrement joue probablement un rôle important au niveau du récepteur.

De même, l'extrémité N-terminale de l'Histamine liée à la Pentagastrine est également bloquée comme dans le cas de la Cimétidine.

Les propriétés inhibitrices du dérivé Pentagastrine-Histamine constatées aussi bien sur la Pentagastrine que sur l'Histamine montrent que ce composé peut ouvrir une voie intéressante dans la recherche des antisecrétoires d'acide gastrique.

III.3 - SYNTHÈSE D'UN IMMUNOGÈNE PGNPS-HIST-BENZ-BSA

Après avoir étudié les propriétés antagonistes des dérivés précédemment synthétisés nous avons commencé de plus à aborder l'étude de leur métabolisme, notamment celui de PGNPS. Pour cette étude il serait souhaitable de pouvoir doser les quantités circulantes de ce dérivé in vivo. Jusqu'à présent les dosages radioimmunologiques des analogues de la Pentagastrine ont toujours été réalisés avec des anticorps dirigés contre la Gastrine G.17. Or la Pentagastrine et la PGNPS se lient à ces anticorps avec une affinité voisine. Ils ne peuvent donc pas permettre de repérer une éventuelle dégradation de PGNPS en PG. Pour réaliser des dosages précis de PGNPS il est indispensable de disposer d'anticorps reconnaissant le plus spécifiquement possible ce dérivé. Il faut donc pouvoir immuniser des animaux contre la PGNPS proprement dite. La Pentagastrine NPS étant un peptide trop petit pour être immunogène par lui-même, son couplage à un support polymérique (sérum albumine de boeuf, polylysine, etc...) est nécessaire.

A cet effet, nous avons voulu d'une part utiliser un "bras" permettant d'écarter cette molécule de la macromolécule porteuse et d'autre part fixer ce bras à l'extrémité réactive ($-COO^-$) de la chaîne latérale de l'acide aspartique de la PGNPS, Boc-βAla-Trp-Met-Asp-Phe NH_2, pour que l'haptène soit
NPS (sur Trp)
reconnu le plus totalement possible, notamment au niveau du groupement NPS et de deux extrémités du peptide.

Un tel bras doit porter à chaque extrémité un groupe fonctionnel pour réagir d'une part avec le groupement carboxyle de la PGNPS et d'autre part avec la protéine porteuse. Or l'Histamine, par son amine primaire sur sa chaîne aliphatique, peut, nous l'avons vu, se condenser à l'acide aspartique, de la PGNPS, et son noyau imidazole, également réactif, pourrait, par

un intermédiaire diazoté, être couplé aux résidus tyrosyles et histidyles de la BSA. L'Histamine est donc susceptible de remplir ce rôle de "bras" et permet de plus d'obtenir un traceur radioactif puisqu'elle peut être marquée à l'Iode 125.

Ces considérations nous ont conduit à synthétiser l'immunogène PGNPS-Hist-Benz-BSA en deux étapes, tout d'abord par la synthèse du dérivé PGNPS-Hist puis par la fixation covalente de ce dérivé aux résidus Histidyles et Tyrosyles de la BSA par l'intermédiaire de benzidine diazotée.

III.3.1 - Pentagastrine NPS-Histamine (PGNPS-Hist)

Deux voies de synthèse ont été utilisées pour obtenir ce composé : soit la fixation du groupement NPS au dérivé Pentagastrine-Histamine préalablement synthétisé, soit le couplage de l'Histamine à la Pentagastrine NPS.

Ces deux voies ont été éprouvées et comparées afin de déterminer celle donnant le meilleur rendement.

III.3.1.1 - Couplage de l'Histamine à la Pentagastrine NPS

Ce couplage nécessite au préalable la synthèse de PGNPS que nous avons préparée dans les conditions préconisées dans le paragraphe II.1.1.2.

III.3.1.1.1 - Pentagastrine NPS

A 50,5 mg (60,7 µmoles) de Pentagastrine en suspension dans 5 ml AcOH on ajoute, à l'abri de la lumière, 15,5 mg (81,9 µmoles soit 1,25 équivalent) d'o-nitrophénylsulfénylchlorure (NPSCl). Après 40 mn d'agitation la Pentagastrine NPS formée étant soluble dans l'acide acétique, la solution est limpide et jaune et la réaction est alors arrêtée.

Les différents constituants du mélange réactionnel sont séparés sur une colonne de Si 60 (h = 48 cm ; Ø = 3 cm) par un gradient d'éthylacétate - B.A.W. (n-Butanol/Acide acétique/Eau : 75/10/20) de 100-0 % à 0-100 % à un débit de 4,8 ml/mn. L'élution est suivie par absorption optique à 280 nm et les trois pics élués successivement à 0 %, 20 % et 100 % B.A.W. sont analysés et caractérisés par CCM (Tableau 8), HPLC (Tableau 9) et spectroscopie. Les trois pics ont ainsi pu être attribués respectivement au NPSCl en excès, à la Boc-PGNPS et à H-PGNPS. La transformation de la Pentagastrine est totale et donne 66,2 % de Boc-PGNPS et 32,8 % de H-PHNPS, d'après les spectres d'absorption réalisés sur les deux fractions chromatographiques.

III.3.1.1.2 - PGNPS-Histamine

La Pentagastrine NPS a été couplée à l'Histamine en appliquant les conditions optimales obtenues pour le couplage de PG à l'Histamine (PG-Hist-OHBT-DCC = 1-1-1.2-2) :

A 1,2 µmole de Boc-PGNPS en solution dans 100 µl de diméthylformamide on ajoute 1,2 µmole d'Histamine (et 5 µCi d'Histamine ^{14}C) en solution aqueuse (9,2 µl H_2O), 1,5 µmole de 1-hydroxybenzotriazole (dans 5 µl DMF) et 2,5 µmoles de dicyclohexylcarbodiimide (dans 12,6 µl DMF). Le pH de la solution est amené à 6 par la N-méthylmorpholine, et le mélange réactionnel est maintenu à 0°C pendant 1 h puis laissé à température ambiante.

La dicyclohexylurée formée est filtrée (sur Millipore LSWP 5 µm) et la réaction est contrôlée par CCM et par HPLC. La radioactivité ^{14}C de l'Histamine est repérée par radio-enregistrement des plaques chromatographiques ainsi que par le comptage des fractions collectées toutes les minutes en sortie de colonne HPLC.

Les caractéristiques du dérivé PGNPS-Hist ^{14}C obtenu sont données dans les Tableaux 8 et 9. Après stabilisation de

TABLEAU 8

R_f obtenus par chromatographie sur couche mince de Silicagel 60 F 254 (Merck).
Eluant : Butanol/Acide Acétique/eau (75/10/20).

Composé	R_f
PG	0,84
NPSCl	0,95
Boc-PGNPS	0,89
H-PGNPS	0,53
Boc-PGNPS-Hist (^{14}C)	0,49
Histamine(^{14}C)	0
OHBT	0,75
Boc-PG-Hist(^{14}C)	0,41

TABLEAU 9

Temps de rétention par HPLC sur colonne Partisil 10.0DS.2 analytique (0,4 x 25 cm).
Eluant : gradient linéaire 20% - 80 % de TEAP 0,1 M pH 3,5
dans l'Acétonitrile.
Débit : 1,2 ml/mn.
Détection : absorption optique à 280 nm.

Composé	T_r (mn)
PG	15,7
Boc-PGNPS	17,7
H-PGNPS	13,98
Boc-PGNPS-Hist (^{14}C)	16,01
Boc-PG-Hist (^{14}C)	14,01
OHBT	5,60

la réaction, l'intégration des pics d'absorption à 280 nm de l'éluat HPLC nous donne un rendement de 38 % (rapport molaire) par rapport à la PGNPS de départ.

Le rendement global des deux étapes est donc de 24,7 %.

III.3.1.2 - Fixation du groupement NPS sur la Pentagastrine-Histamine

Comme dans le cas de la fixation de ce groupement sur le Tryptophane de la Pentagastrine seule, le NPSCl (1,5 µmole) a été ajouté en milieu acide acétique (450 µl) à la PG-Hist ^{14}C déjà synthétisée(0,8 µmole).

Le mélange est agité pendant 30 mn puis la réaction est contrôlée par CCM sur silice dans du B.A.W. et mesure de la radioactivité de la plaque pour repérer l'Histamine ^{14}C. Les R_f sont donnés dans le Tableau 8.

Le mélange réactionnel est également analysé par HPLC en suivant l'absorption à 280 nm. L'éluat est collecté par fractions de 1 mn et la radioactivité ^{14}C de chaque fraction est mesurée. La mesure de radioactivité ^{14}C des pics d'absorption nous a permis de déterminer un rendement de Boc-PGNPS-Hist ^{14}C pure de 71 % par rapport au dérivé PG-Hist ^{14}C.

La synthèse de PG-Hist ^{14}C à partir de la Pentagastrine ayant été réalisée avec 67,5 % de rendement, l'efficacité globale de cette voie de synthèse de Boc-PGNPS-Hist est donc supérieure (47,9 % au lieu de 24,7 %) à celle du couplage direct de l'Histamine à la Pentagastrine NPS.

Nous avons donc utilisé cette voie de synthèse pour préparer une plus grande quantité de PGNPS-Hist en vue de la préparation de l'immunogène :

On a fait réagir 8,33 mg (43,9 µmoles) de NPSCl avec 30,5 µmoles de PG-Hist ^{14}C dans 3 ml d'acide acétique. Après

45 mn d'agitation la fin de la réaction est contrôlée par chromatographie sur couche mince (dans B.A.W.), mesure de la radioactivité ^{14}C de la plaque, et HPLC analytique. Le dérivé PGNPS-Hist ^{14}C est alors purifié par chromatographie sur colonne de Silice 60 (L = 48 cm ; Ø = 3 cm) avec un gradient d'élution de 0 à 100 % de B.A.W. dans l'éthylacétate à un débit de 1,7 ml/mn. La pureté du pic obtenu est contrôlée par HPLC analytique, CCM et radioenregistrement (figure 36).

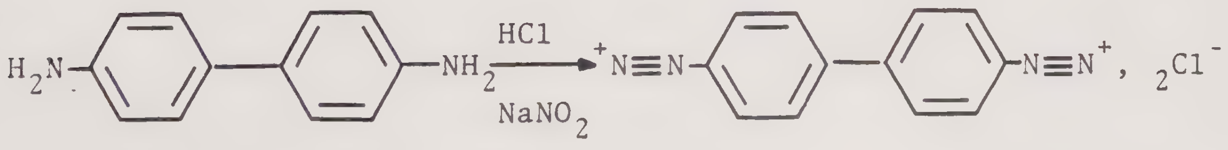
D'après son spectre d'absorption (ε_{288} = 17 200 cm^{-1}.$mole^{-1}$.l ; ε_{360} = 4 300 cm^{-1}.$mole^{-1}$.l), nous avons obtenu 29 mg (28,6 µmoles) de Boc-PGNPS-Histamine ^{14}C pure. Le rendement global de ce couplage et de la purification a donc été de 93,8 %. Ce chiffre, supérieur à celui obtenu à l'échelle analytique (71 %) peut s'expliquer par une concentration plus élevée des réactifs.

Le produit a ensuite été lyophilisé.

III.3.1.3 - Synthèse de l'immunogène Boc-Pentagastrine NPS-Histamine-Benzidine-BSA

En collaboration avec le L.E.R.I. (Département de Biologie), la Pentagastrine NPS-Histamine a été couplée à l'albumine de sérum de boeuf (BSA) par l'intermédiaire de Benzidine diazotée (dichlorure de 4-4'-diazodiphényle), selon la méthode de Bassiri et Utiger / 6 /.

La Benzidine est diazotée en milieu acide par du nitrite de sodium :



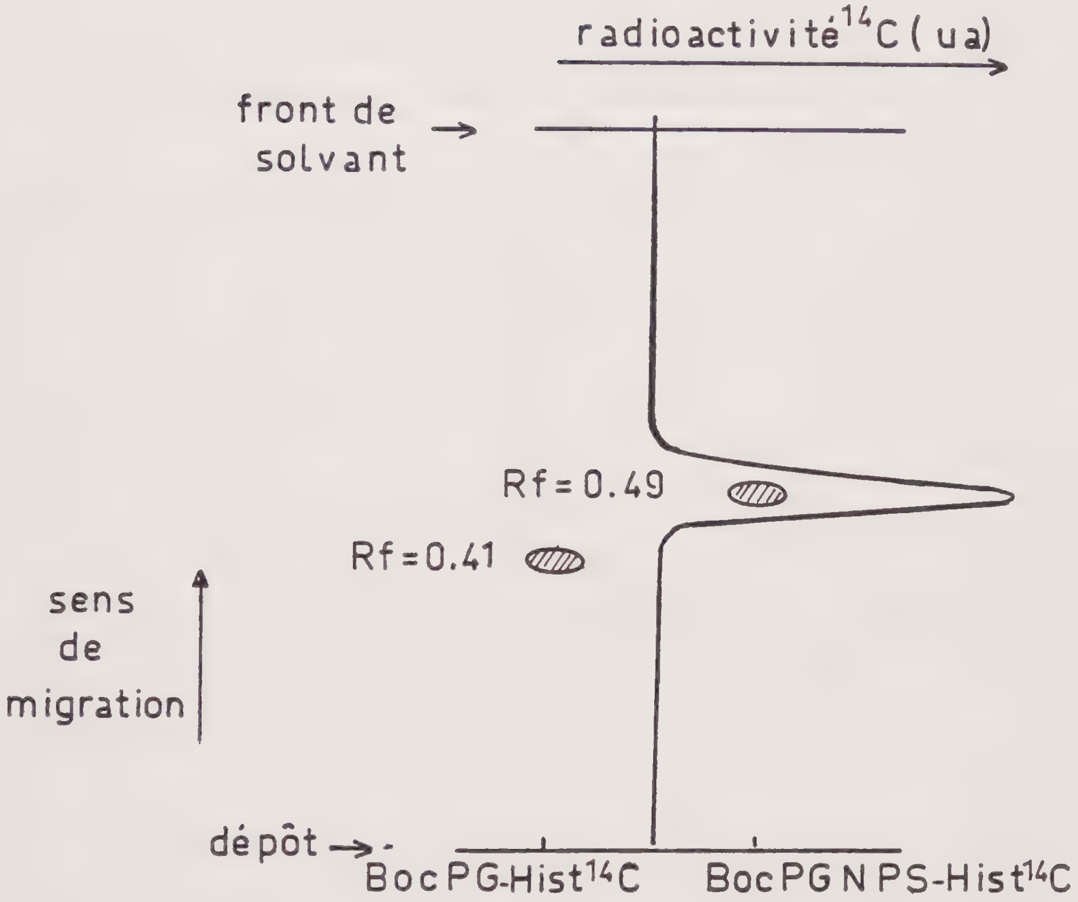
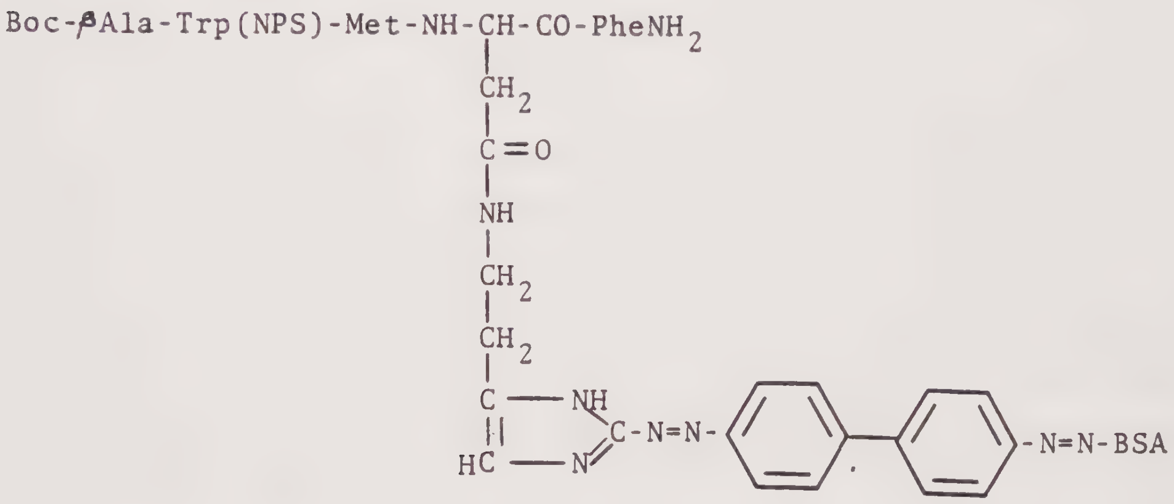


Figure 36 - Contrôle de pureté du dérivé BocPGNPS-Histamine ^{14}C par chromatographie sur couche mince de silice et mesure de la radioactivité ^{14}C .
Eluant : Butanol/Acide acétique/Eau : 75/10/20
Révélateur : Visible , TMD

La Benzidine diazotée a ainsi été préparée par action de 175 mg de $NaNO_2$ dans 5 ml H_2O sur 230 mg de Benzidine en solution dans 45 ml HCl 0,2 N, pendant 60 mn à 4°C.

Le sel de diazonium ainsi obtenu peut alors réagir à la fois sur l'Histamine et sur les groupements Histidyles et Tyrosyles de la BSA pour donner l'immunogène :



Ainsi 5 mg de PGNPS-Hist ^{14}C (4,93 µmoles) et 50 mg (0,7 µmole) de BSA en solution dans un mélange tampon borate-NaCl-Diméthylformamide (50/50) sont mis sous agitation à 4°C. 5 ml de la solution de benzidine diazotée (8 mg) sont alors ajoutés et le pH est ajusté à 9 par NaOH. La réaction est maintenue à 4°C et sous agitation pendant 1 nuit.

Le composé PGNPS-Hist-Benz-BSA est purifié par 4 dialyses successives contre une solution aqueuse de NaCl 9 °/₀₀ à 4°C, après avoir vérifié sur une aliquote , par précipitation du complexe au propanol , que tout le peptide est fixé à la protéine .

D'après les comptages de radioactivité ^{14}C, il a été fixé 6 moles de PGNPS-Histamine ^{14}C par mole de BSA.

III.3.2 - Pentagastrine NPS-Histamine ^{3}H

Le dosage d'anticorps anti-Pentagastrine NPS nécessitera un traceur homologue radioactif de l'antigène. Le composé PGNPS-Histamine offre la possibilité théorique de fixer de l'Iode 125 sur l'Histamine mais, comme nous le verrons dans les chapitres suivants, l'iodation de dérivés de la Pentagastrine pose de nombreux problèmes de dégradation du peptide (notamment l'oxydation de la Méthionine). Par ailleurs, le dérivé PGNPS-Hist peut également être synthétisé en utilisant de l'Histamine tritiée. Bien que la présence de Tritium conduise à une radioactivité spécifique plus faible que celle que permet d'atteindre la fixation d'Iode 125, la première paraît suffisante pour les dosages envisagés et le Tritium a l'avantage de donner un traceur similaire à l'haptène.

La microsynthèse du dérivé PGNPS-Histamine ^{3}H a été réalisée par couplage de la Pentagastrine NPS à l'Histamine tritiée dans les mêmes conditions que pour l'Histamine non radioactive (ou avec traceur ^{14}C seulement).

L'Histamine tritiée est sous forme Histamine ^{3}H-2-5-Chlorhydrate de radioactivité spécifique 10 Ci/mmole, en solution dans un mélange éthanol/acide chlorhydrique 0,01 M à 1 mCi/ml.

- *Mode opératoire*

50 nmoles d'Histamine ^{3}H (0,5 mCi) en solution dans 500 µl de mélange éthanol/acide chlorhydrique N/100, sont lyophilisées. On y ajoute 60 nmoles de PGNPS (55 µg) dans 19,1 µl de diméthylformamide puis 120 nmoles de dicyclohexylcarbodiimide

(24,8 µg dans 7,6 µl DMF), 59,3 nmoles de 1-hydroxybenzotriazole (8 µg dans 4,6 µl DMF), 60,5 nmoles de pentachlorophénol (16,1 µg dans 10,4 µl DMF) et 0,76 µmole de triéthylamine (10,6 µl Et_3N 1/100 dans DMF).

Le pentachlorophénol permet d'éviter la formation de dérivés aminosuccinyles (sur le résidu Asp de la Pentagastrine NPS) sans interférer d'aucune manière avec l'effet catalytique du 1-hydroxybenzotriazole / 63 /.

L'avancement de la réaction est suivi par CCM sur plaque de silice dans du B.A.W. et mesure de la radioactivité ^3H. La réaction est terminée après 240 h à température ambiante, et on observe alors par chromatographie sur couche mince la formation d'une quantité importante du dérivé PGNPS-Histamine ^3H (figure 37) dont le pic de radioactivité ^3H coïncide avec le R_f de la PGNPS-Hist ^{14}C témoin (R_f = 0,57).

Le mélange réactionnel a alors été séparé par HPLC sur colonne analytique Partisil-10-ODS-2 par un gradient d'élution de 68 % à 20 % d'acétate d'ammonium 0,01 N pH 4,7 dans l'acétonitrile, à un débit de 1,2 ml/mn.

En sortie de colonne chaque fraction de 1 mn est collectée et sa radioactivité ^3H est mesurée. Le pic de radioactivité ^3H, coïncidant avec le temps de rétention (T_R = 22 mn) de la PGNPS-Hist ^{14}C injectée comme témoin dans le même système d'élution et suivie par absorption optique à 280 nm, est alors recueilli (figure 38, pic hachuré).

On a ainsi obtenu 200 µCi de PGNPS-Histamine ^3H à une radioactivité spécifique de 10 Ci/mmole.

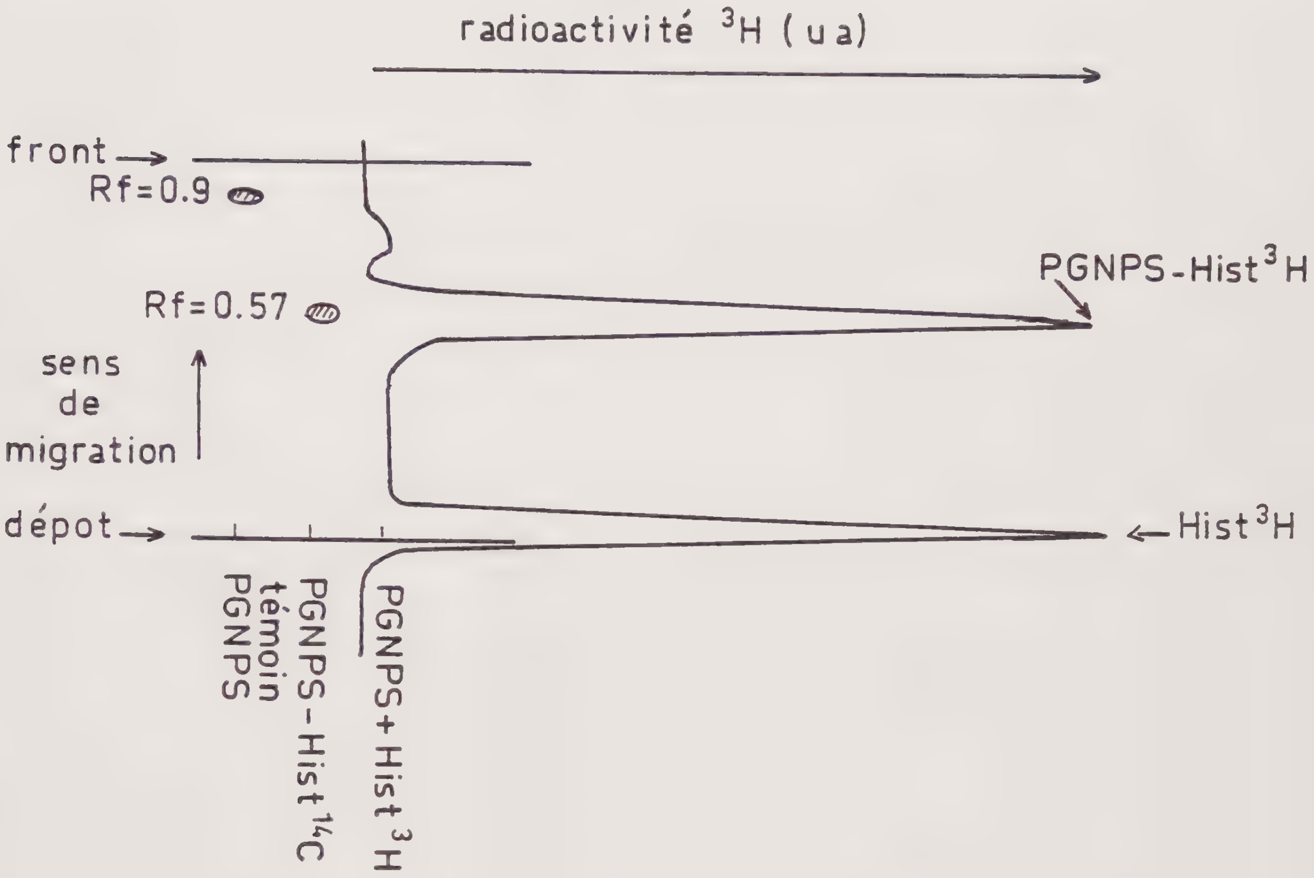


Figure 37 - Contrôle de la synthèse de la PGNPS-Histamine ^{3}H par chromatographie sur couche mince de silice et mesure de la radioactivité ^{3}H .
Eluant : Butanol/Acide acétique/Eau : 75/10/24
Révélateur : UV , Visible , TMD

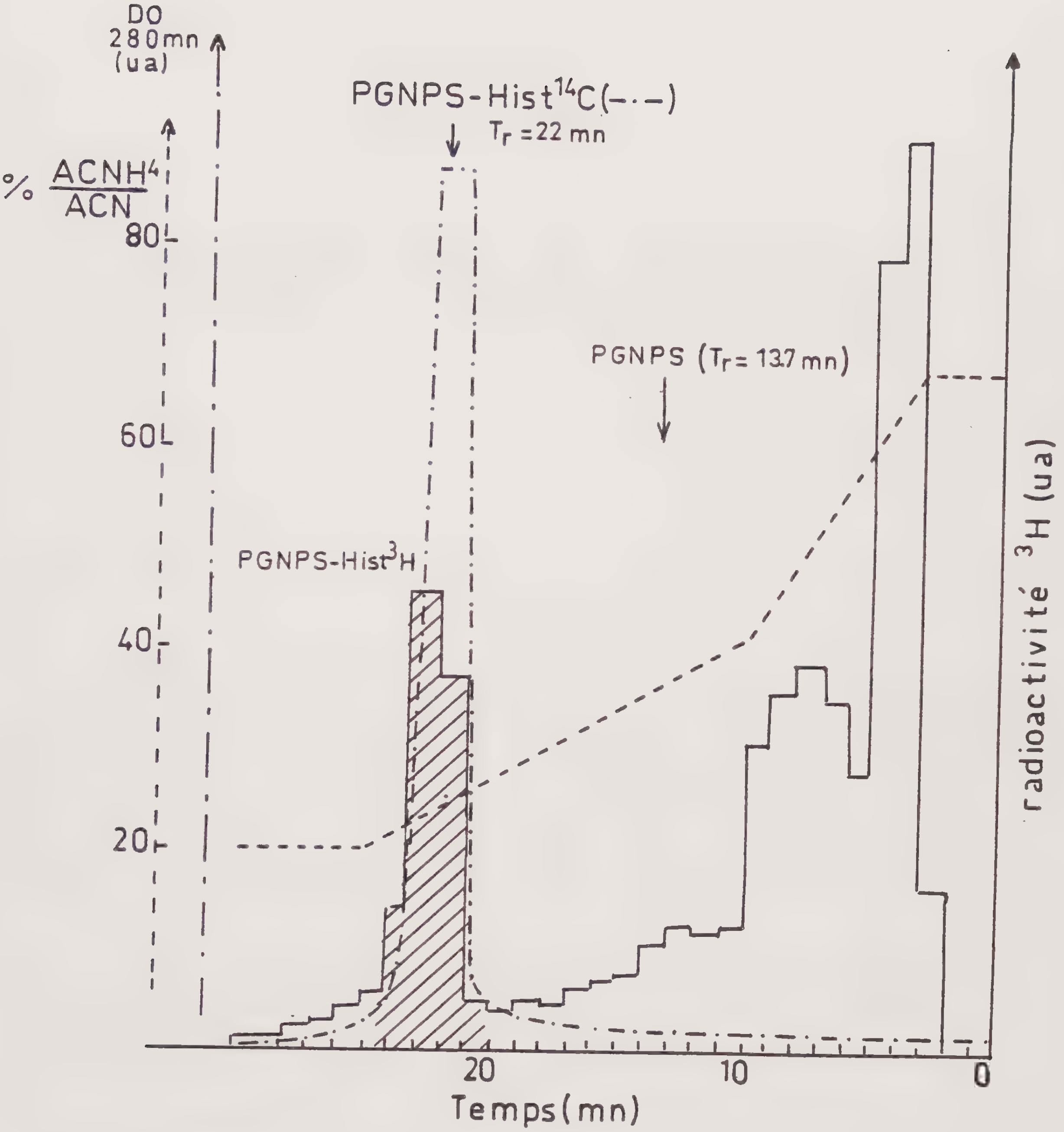


Figure 38 - Purification de PGNPS-Histamine ^{3}H sur HPLC analytique Partisil 10-ODS-2 par un gradient de 68% à20% d' acétate d'ammonium 0.01M pH 4.7 dans l'acétonitrile . débit 1.2 ml/mn .

DEUXIEME PARTIE

SYNTHESE D'ANALOGUES RADIOACTIFS NECESSAIRES A L'ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE LA PENTAGASTRINE ET DE SES DERIVES.

- INTRODUCTION

Les études pharmacologiques de peptides hormonaux à des concentrations physiologiques nécessitent, comme nous l'avons déjà mentionné, des homologues radioactifs qui permettent leur détection soit dans des études de fixation au récepteur, soit dans des dosages radioimmunologiques, soit encore dans des études de distribution tissulaire ou de métabolisme in vivo.

Selon le type d'étude suivie, différents marquages peuvent être utilisés, les principaux marqueurs couramment employés étant le Tritium et l'Iode 125.

Un atome de Tritium substitué à un proton d'un peptide lui confère une radioactivité spécifique théorique de 29 Ci/mmole sans modifier notablement les propriétés chimiques et physiques de cette molécule. Les molécules tritiées sont ainsi particulièrement adaptées aux études de liaison , de distribution et de métabolisme dans la mesure où l'on ne considère que les scissions intéressant la seule chaîne polypeptidique. .

Le marquage à l'iode ^{125}I, s'il offre une radioactivité spécifique beaucoup plus élevée, 2 000 Ci/m.atome présent dans la molécule, introduit de nombreuses perturbations importantes par :

1) la taille de l'atome d'iode, supérieure à celle d'un noyau benzénique, qui lui confère un encombrement très élevé ;

2) ses propriétés hydrophobes qui accroissent considérablement l'adsorption non spécifique du peptide iodé sur toutes sortes de surfaces et ce au point que tout peptide iodé peut être séparé,par chromatographie d'adsorption,de la molécule parentale ;

3) la perturbation du nuage électronique du noyau aromatique porteur qui se traduit par un déplacement de son maximum d'absorption vers les grandes longueurs d'ondes.

Un peptide iodé est ainsi un analogue du peptide parental , mais dont le comportement biologique doit être étudié avant que le dérivé halogéné soit considéré comme représentatif du peptide originel. Au contraire, dans le cadre de radio-immunoessais la présence d'iode dans le peptide considéré ne crée pas, en général, de difficultés. De plus,par la nature de son rayonnement (γ) l'Iode 125 permet de suivre par scintigraphie la distribution tissulaire in vivo du peptide marqué.

La Gastrine a été souvent marquée, soit par le Tritium / 35 / soit par l'Iode 125 / 21, 83, 7, 92 / ou l'Iode 131 / 40 /. Par contre, le marquage radioactif de la Pentagastrine a été peu étudié.

Une méthode de tritiation de la Pentagastrine a été proposée par Marche et al. / 62 /, par substitution catalytique, par un atome de Tritium, d'un groupement NPS préalablement fixé en C_2 du noyau indolique du résidu Tryptophane. On obtient, dans ce cas, une molécule possédant une radioactivité spécifique de

7 Ci/mmole. Le désir de conserver le groupement NPS responsable des propriétés antagonistes du peptide, nous a conduit à rechercher une autre méthode de tritiation de la Pentagastrine.

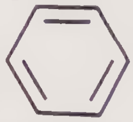
Dans un premier temps nous avons étudié l'incorporation de Tritium au résidu Phe de la Pentagastrine par tritiation catalytique du dérivé (p-Cl-Phe^5)-Pentagastrine. Le produit obtenu présente une radioactivité spécifique faible (< 2 Ci/mmole, résultats non publiés). Ce résultat provient de la lente cinétique de déshalogénation. Le palladium catalyse en effet deux réactions simultanément : la substitution de l'atome de chlore par le tritium activé et l'échange de ce tritium avec les protons du solvant. Si la première réaction est lente, et c'est le cas le plus fréquent lorsque l'on souhaite substituer un atome de chlore, la seconde qui est rapide conduit à une dilution du tritium associé au palladium.

Pour obtenir une radioactivité spécifique plus élevée c'est un (ou plusieurs) atome(s) d'iode qu'il faut substituer par le tritium. Dans cette optique nous avons tiré parti de la tolérance de la Pentagastrine à l'égard du prolongement de son squelette du côté N-terminal, et avons ajouté un résidu diiodo-tyrosyle en ce point. La molécule ainsi synthétisé, l'Hexa-gastrine diiodée Boc-Tyr(I_2)-βAla-Trp-Met-Asp-Phe NH_2, conduit, après déshalogénation, à un peptide très voisin du fragment C-terminal naturel de la Gastrine (Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe NH_2).

Par surcroît, outre le dérivé tritié ainsi obtenu nous avons souhaité aussi disposer d'un analogue de la Pentagastrine marqué à l'Iode 125. Dans ce but c'est un résidu tyrosyle seul qui a été couplé à l'extrémité N-terminal de la Pentagastrine. L'Hexagastrine (Boc-Tyr-PG) ainsi obtenue, apporte la possibilité d'une iodation par ^{125}I.

III.4 - SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS ET DES PEPTIDES STANDARD

La titration catalytique de Boc-Tyr(I_2)-PG (HG(I_2)) peut conduire théoriquement à des dérivés monotritiés (car monodéshalogénés) et ditritiés. Par ailleurs, l'iodation de HG par la Chloramine T donne lieu à la formation de nombreux produits qui peuvent être des dérivés mono ou diiodés ainsi que leurs produits d'oxydation. En effet, la Chloromine T

CH_3 -  -$SO_2NCl^-Na^+$ en solution aqueuse s'hydrolyse et libère de l'acide hypochloreux ClO^-, oxydant puissant, susceptible non seulement d'oxyder les atomes d'iodure I^- en I^+ mais aussi l'atome de soufre du résidu Méthionyle du peptide. Ceci nous a amené à synthétiser au préalable ces différents composés : l'hexagastrine, l'hexagastrine monoiodée, l'hexagastrine diiodée, l'hexagastrine oxydée, l'hexagastrine monoiodée oxydée et l'hexagastrine diiodée oxydée. Ils nous permettront non seulement d'avoir les référence analytiques nécessaires mais également de pouvoir comparer leurs propriétés biologiques et immunologiques.

III.4.1 - Synthèse de l'Hexagastrine (HG)

Ce peptide a été obtenu par couplage de la Pentagastrine (Boc-PG), après déprotection de l'extrémité N-terminale, avec l'ester N-hydroxysuccimimide Boc-Tyr-Osu.

III.4.1.1 - Déprotection de la Pentagastrine

100 mg de Boc-Pentagastrine (Butyloxycarbonyl-βAla-Trp-Met-Asp-Phe NH_2) sont dissous à 0°C dans 20 ml du mélange suivant : acide trifluoroacétique/dichlorométhane/acide thioglycolique (49/49/2, v/v). La présence de l'acide thioglycolique (ou de β-mercaptoéthanol) est nécessaire pour empêcher la dété-

rioration du Tryptophane en milieu acide. Après une heure de réaction sous agitation la solution est concentrée à 2 ml et le sel de TFA-PG est précipité par 50ml d'éther. Le précipité est alors filtré, lavé à l'éthylacétate et séché au dessicateur. Après remise en solution dans 2 ml de Diméthylformamide et nouvelle précipitation avec 100 ml d'éthylacétate on obtient un produit parfaitement pur avec un rendement de 95 %.

III.4.1.2 - Synthèse de HG (Boc-Tyr-PG)

Dans un réacti-vial de 3 ml, 7,9 µmoles de triéthylamine et 8,3 µmoles de Boc-Tyr-Osu sont ajoutées à une solution de 6,5 µmoles (5,08 mg) de TFA-PG dans 200 µl de Diméthylformamide. La réaction, conduite à température ambiante et sous agitation magnétique et suivie par chromatographie sur couche mince, est terminée au bout de 3 heures. L'hexagastrine est alors purifiée par chromatographie sur colonne de Séphadex LH 20 (75 cm x 1,5 cm) dans du Diméthylformamide puis sur colonne de Silicagel Si 60 (30 cm x 2 cm) avec un mélange Butanol-Acide acétique-Eau (75-10-20) / Ethylacétate (20/80 v/v).

La pureté du produit est contrôlée par chromatographie sur couche mince.

L'analyse d'acides aminés du produit donne les résultats suivants (valeurs rapportées à Phe): Tyr : 0,95 ; Met : 1,08 ; Asp : 1,04 ; Phe : 1.

Le rendement de la réaction est de 71,5 %.

III.4.2 - Synthèses de l'Hexagastrine mono ou diiodée (HGI ou HGI_2)

Ces deux composés ont été obtenus par couplage de la Pentagastrine, préalablement déprotégée à son extrémité N-terminale, à la tyrosine mono ou diiodée activée en ester de pentachlorophénol.

III.4.2.1 - Synthèse de Boc-Tyr(I)-OPCP et Boc-Tyr(I_2)-OPCP

1 mmole de Boc-3-iodo-tyrosine ou de Boc-3,5-diiodo-tyrosine est dissoute dans 5 ml d'éthylacétate et refroidie à 0°C avant l'addition de 1,1 mmole de Pentachlorophénol (PCPOH) et 1 mmole de dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Après 1 heure d'agitation à 0°C et 8 heures à 25°C la dicyclohexylurée est filtrée. La solution est concentrée jusqu'à sec puis reprise dans 30 ml d'éthylacétate, traitée par du charbon actif, filtrée et cristallisée par addition de 60 ml d'hexane. La cristallisation est obtenue en 12 heures à 4°C. Les cristaux obtenus sont filtrés et séchés.

La pureté des produits est contrôlée par CCM.

Les points de fusion de ces deux composés sont respectivement : 135,7°C et 166,5°C pour les dérivés mono et diiodé.

III.4.2.2 - Synthèse de HGI (Boc-Tyr(I)-PG) et de HGI_2 (Boc-Tyr(I_2)-PG)

A 50 µmoles (39 mg) de TFA, Pentagastrine (obtenue selon § III.4.1.1) dissoutes dans 1 ml de Diméthylformamide, on ajoute 50 µmoles de N-méthylmorpholine (55 µl d'une solution à 10 % dans le Diméthylformamide) et 75 µmoles de Boc-Tyr(I)-OPCP ou de Boc-Tyr(I_2)-OPCP.

La solution est maintenue sous agitation pendant 20 heures à 20°C. Après l'addition de 50 ml d'HCl 0,01 N les hexapeptides sont précipités par 15 ml d'éther. Le précipité est alors filtré, lavé à l'éther et séché. L'identification et la pureté des hexapeptides sont contrôlées sur plaque chromatographique et par HPLC. Le rendement de couplage est de 60 % pour la monoiodohexagastrine et de 71 % pour la diiodohexagastrine.

III.4.3 - Synthèse de l'Hexagastrine oxydée (HGox), de la monoiodohexagastrine oxydée (HGIox) et la diiodo-hexagastrine oxydée (HGI_2ox)

10 µmoles du peptide natif (HG, HGI ou HGI_2) mises en solution dans 400 µl d'acide acétique sont additionnées de 12 µmoles d'eau oxygénée (13,4 µl d'une solution à 3 % dans l'acide acétique). Après 1 heure de réaction, le peptide oxydé est précipité dans l'éther, lavé à l'éther et à l'hexane et lyophilisé. La réaction est totale. Les peptides sont caractérisés par chromatographie sur couche mince ou sur colonne.

III.5 - CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS DE RÉFÉRENCE (HG, HGI, HGI_2, HGOX, HGIOX, HGI_2OX)

III.5.1 - Chromatographie sur couche mince

Les différents composés synthétisés précédemment ont été caractérisés par chromatographie sur couche mince et leur pureté a pu être ainsi contrôlée.

Les R_f obtenus sur plaque de silice dans différents systèmes d'élution sont donnés dans le Tableau 10.

III.5.2 - Séparation des dérivés iodés et/ou oxydés de l'Hexagastrine par chromatographie liquide à haute performance

Nous avons mis au point plusieurs systèmes de chromatographie liquide à haute performance permettant de séparer l'Hexagastrine de chacun de ses dérivés iodés et/ou oxydés : l'hexagastrine monoiodés (HGI), l'hexagastrine diiodée (HGI_2), l'hexagastrine oxydée (HGox), l'hexagastrine monoiodée oxydée (HGIox) et l'hexagastrine diiodée oxydée (HGI_2ox).

TABLEAU 10

Valeurs des R_f obtenus sur des plaques analytiques de Silice (LK6 DF, Whatman, 0,25 mm, 20 x 20 cm, lot n° 000865)

	B.A.W. - EtoAc			Chloroforme /Hexane/ Acide acétique 8/1/1	EtoAc / Pyridine/ Acide acétique/Eau 60/20/6/11
	15/85	30/70	100/0		
HG	0,13	0,65	0,87	0	0,86
HGI	0,14	0,68	0,88	0	0,90
HGI_2	0,18	0,72	0,91	0	0,93
HGox	0	0,13	0,77	0	0,41
HGIox	0	0,14	0,77	0	0,44
HGI_2ox	0	0,16	0,77	0	0,50
de Boc-PG	0	0	0,32	0	0,16
Boc-Tyr-Osu	0,93	0,95	0,97	0,36	0,97
Boc-Tyr(I)-OPCP	0,97	0,98	0,99	0,86	0,98
Boc-Tyr(I_2)-OPCP	0,98	0,99	0,99	0,94	0,98

Les caractéristiques de ces sytèmes de chromatographie HPLC (support, solvants d'élution, débit) sont données dans le Tableau 11 et les temps de rétention obtenus pour chacun des peptides dans les différents systèmes sont reportés dans le Tableau 12.

Le profil d'élution obtenu par le système VII est donné, à titre d'exemple, sur la figure 39.

III.5.3 - Activité biologique

Nous avons mesuré l'activité biologique des différents peptides précédemment synthétisés dans le but, notamment, d'étudier les effets induits par les différentes modifications qui peuvent être apportées à la Pentagastrine au cours des marquages au Tritium ou à l'Iode 125.

III.5.3.1 - Effet de l'addition d'un résidu Tyrosyle

L'activité biologique de l'Hexagastrine (Boc-Tyr-PG) a tout d'abord été comparée à celle de la Pentagastrine : les réponses secrétoires obtenues par injections uniques de ces deux composés à deux doses différentes sont reportées ci-dessous (en µmoles H^+/40 mn) :

	1,3 nmoles/kg	5,2 nmoles/kg
PG	5,8 ± 1,0	9,0 ± 1,5
HG	5,6 ± 1,6	8,9 ± 0,8

La similitude des résultats obtenus pour les deux peptides confirme bien que l'addition du résidu Tyrosyle à l'extré-

TABLEAU 11

Description des systèmes de chromatographie HPLC sur colonne analytique 250 mm x 4,6 mm

N°	Support	Solvant d'élution	Débit
I	Partisil 10.ODS.2	ACN/TEAP 0,1 M pH 3,5 (45/55)	1,2 ml/mn
II	Partisil 10.ODS.2	ACN/TEAP 0,1 M pH 3,5 (40/60)	1,2 ml/mn
III	Partisil 10.ODS.2	ACN/$AcNH_4$ 0,05 M pH 4,75 (35,6/64,4)	1,2 ml/mn
IV	Partisil 10.ODS.2	ACN/$AcNH_4$ 0,05 M pH 4,75 (35,6/64,4)	1,5 ml/mn
V	µBondapak C18	ACN/$AcNH_4$ 0,05 M pH 4,75 (38/62)	1,2 ml/mn
VI	µBondapak C18	ACN/$AcNH_4$ 0,05 M pH 4,75 (gradient en 15 mn de (34/66) à (42/58)	1,2 ml/mn
VII	µBondapak C18	ACN/$AcNH_4$ 0,05 M pH 4,75 (gradient en 20 mn de (35/65) à (65/35)	1,2 ml/mn

Abréviations: ACN : acétonitrile
TEAP : tampon triéthylamine phosphate
$AcNH_4$: acétate d'ammonium

TABLEAU 12

Temps de rétention (mn) obtenus dans les différents systèmes HPLC

N° système	HGox	HGIox	HG	HGI_2ox	HGI	HGI_2
I	3,0	3,9	4,5	6,0	6,6	11,6
II	4,2	5,5	6,4	9,7	11,4	22,2
III	4,4	8,2	8,5	14,8	18,0	34,0
IV	2,1	3,5	4,0	6,6	8,3	16,7
V	4,3	6,1	6,7	9,2	10,7	17,7
VI	3,7	7,9	8,4	12,1	13,8	17,6
VII	2,5	6,0	7,0	9,4	10,4	12,9

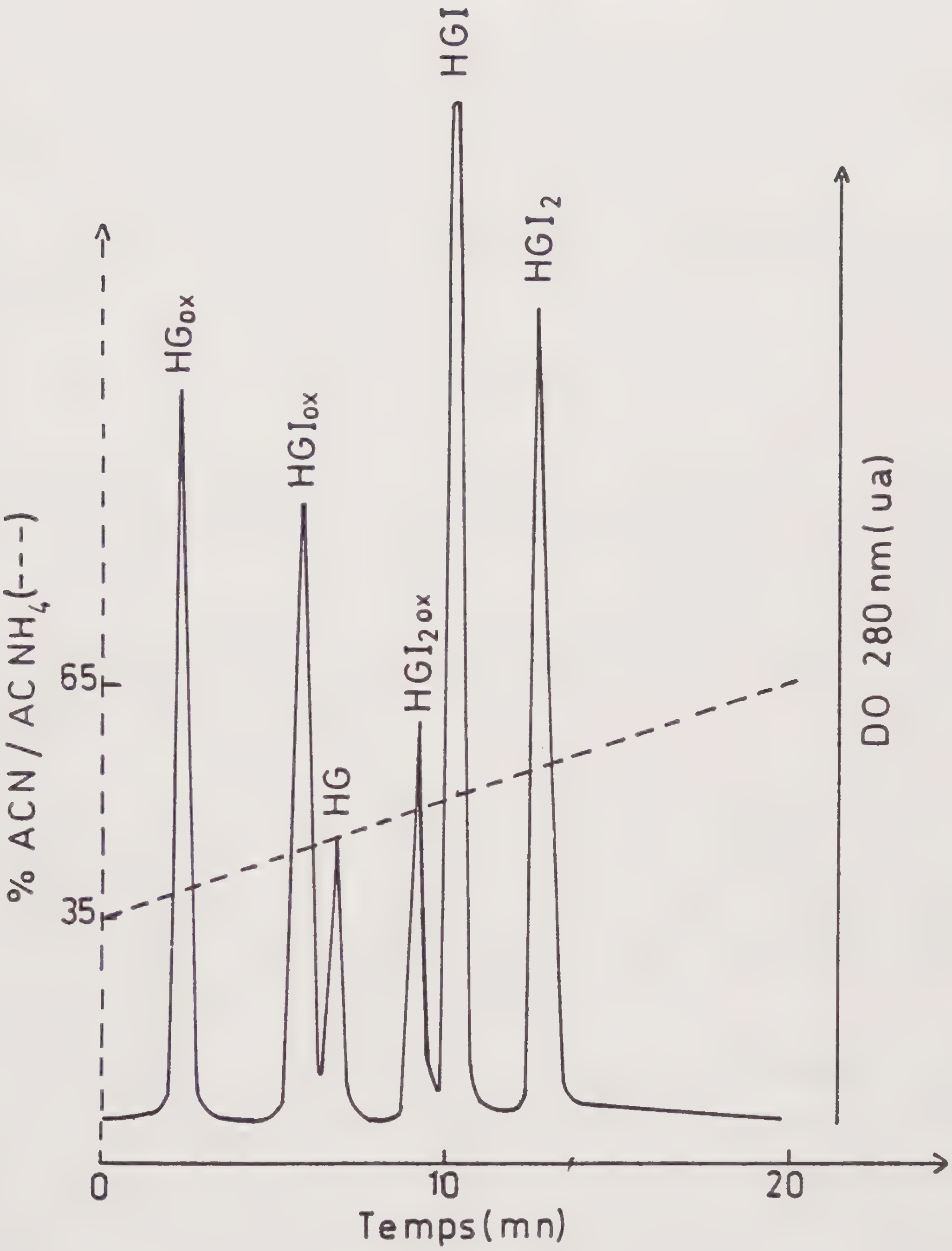


Figure 39 - Séparation par HPLC μBondapak C18 (système VII) des dérivés oxydés et/ou iodés de l'Hexagastrine .

mité N-terminale de la Pentagastrine n'altère pas son activité biologique, résultat prévisible puisque ce résidu est présent à cette même position dans la Gastrine entière.

On pourra donc utiliser l'Hexagastrine comme référence dans ce qui suit.

III.5.3.2 - Effet de l'iodation

L'Hexagastrine et ses dérivés mono et diiodés ont été perfusés à plusieurs doses différentes, et la secrétion stimulée collectée pendant 6 fractions de 20 mn pour chaque dose.

Les moyennes de ces effets stimulants (± ESM) obtenus sur un groupe de 6 rats sont reportées sur la figure 40 pour chacune des doses testées.

Ces résultats nous montrent que l'Hexagastrine mono-iodée manifeste une activité biologique identique à celle de l'Hexagastrine mais que l'Hexagastrine diiodée est biologiquement moins active, provoquant dans des conditions comparables, une secrétion acide inférieure d'environ 35 %.

En outre, la figure 41, qui montre les stimulations de secrétions induites par la perfusion des dérivés mono et diiodés en fonction du temps (par fraction de 20 mn), permet une autre observation : pour une même quantité injectée, la valeur maximale de secrétion acide est atteinte beaucoup plus tardivement avec l'Hexagastrine diiodée qu'avec l'Hexagastrine monoiodée, le décalage étant d'environ 1 heure. Ce phénomène, qui n'a pas été étudié en soi dans ce travail, pourrait traduire une adsorption non spécifique de l'Hexagastrine diiodée qui en ralentit l'accès aux cellules cibles. Il pourrait correspondre aussi à un tout autre phénomène : l'Hexagastrine diiodée, serait par elle-même, inactive, et subirait une désiodation conduisant à un dérivé actif. Le temps de latence observé pendant la première heure est compatible avec une telle hypothèse.

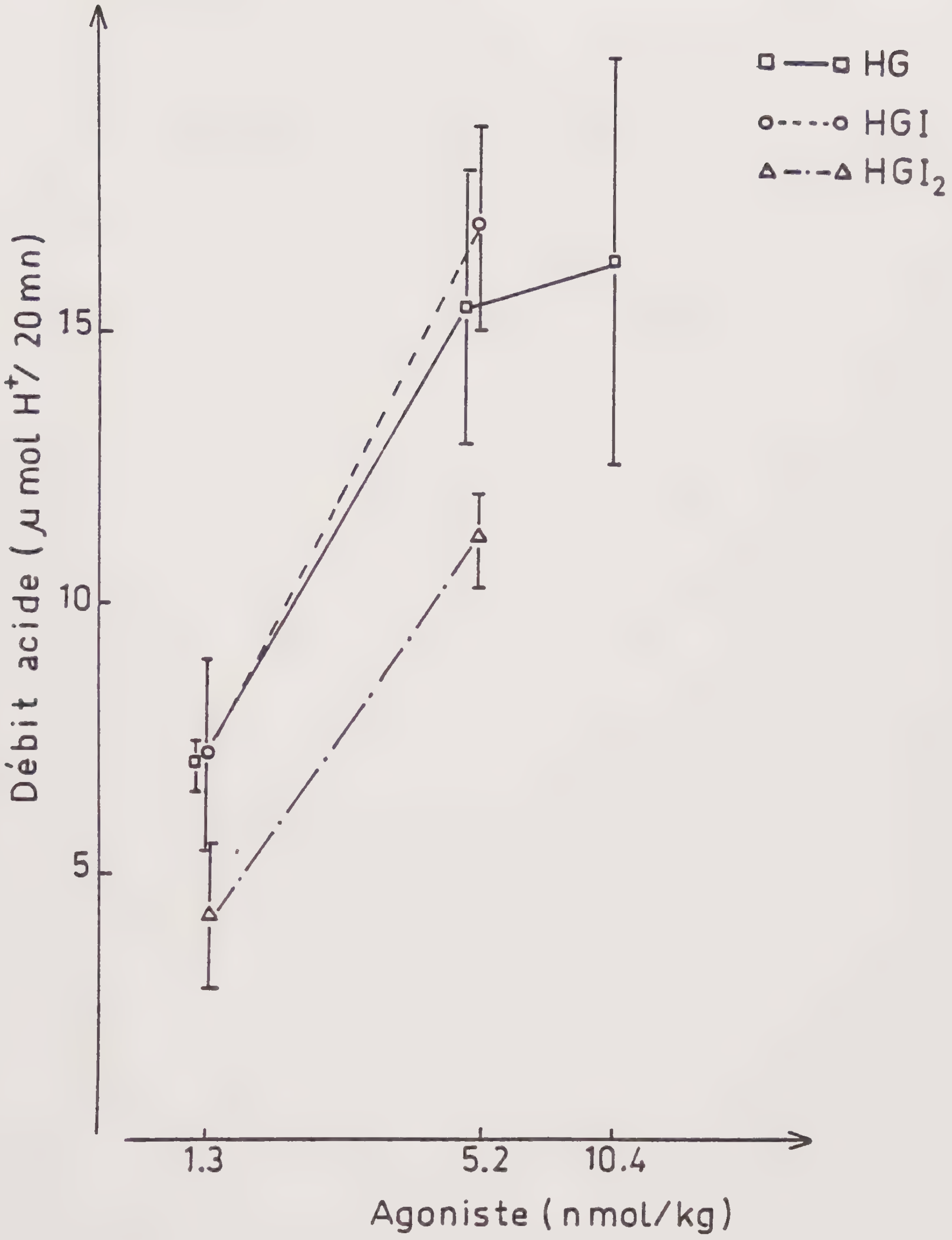


Figure 40 - Courbes dose-réponse de l'Hexagastrine (□——□) , l'Hexagastrine monoiodée (o----o) et de l'Hexagastrine diiodée (△—·—△) .

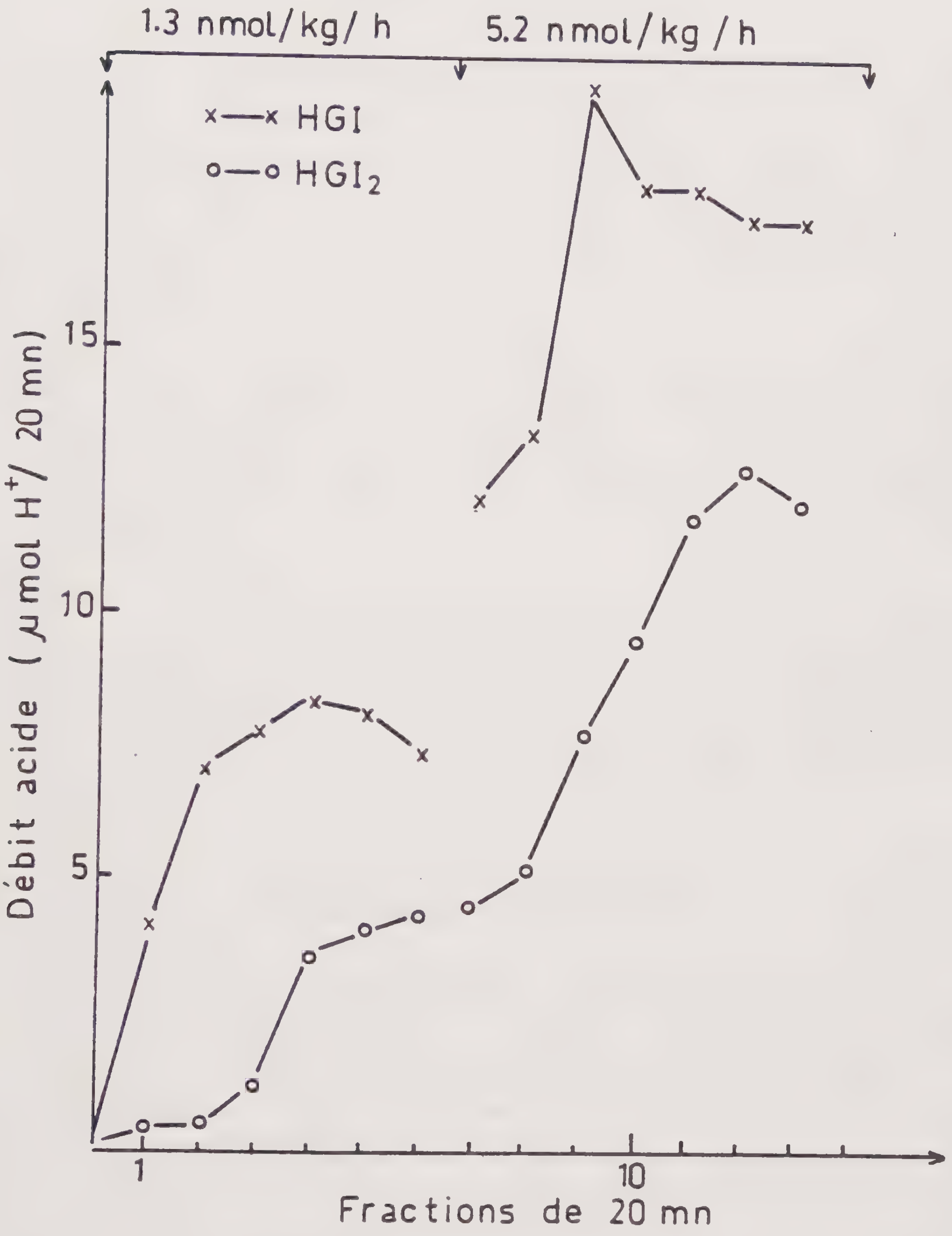


Figure 41 - Réponses secrétoires, par fractions de 20 mn, de HGI (x——x) et HGI_2 (o——o) perfusées à 1.3nmol/kg/h puis 5.2 nmol/kg/h .

III.5.3.3 - Effet de l'oxydation

Les réponses secrétoires obtenues par perfusion, à la dose de 5,2 nmoles/kg de l'Hexagastrine et de ses dérivés mono et diiodés ainsi que de leurs 3 analogues oxydés, sont reportés sur la figure 42. On peut constater que dans les trois cas l'oxydation des peptides entraîne une baisse importante de l'activité biologique.

En comparant les résultats reportés sur les figures 40 et 42 on remarque que la stimulation induite par les dérivés oxydés à la dose de 5,2 nmoles/kg est à peu près identique à celle obtenue à la dose de 1,3 nmole/kg par les homologues non oxydés.

L'oxydation et la diiodation entraînent donc une baisse importante de l'activité biologique de l'Hexagastrine. Seule la monoiodohexagastrine non oxydée conserve, en première analyse, les propriétés biologiques de l'Hexagastrine et de la Pentagastrine.

III.5.4 - Dosages radioimmunologiques

Les courbes de dosage radioimmunologique des 6 analogues de l'Hexagastrine (iodés et oxydés) reportés sur les figures 43.A et 43.B suggèrent que ces dérivés sont reconnus de façon identique par l'antisérum anti-Gastrine utilisé.Celui-ci ayant été obtenu après immunisation de lapins avec la Gastrine G (2-17) couplée à la BSA par son extrémité N-terminale, il contient donc des anticorps dirigés contre différentes parties de l'hormone. Ce sont probablement ceux dirigés contre le tétra- ou pentapeptide C-terminal qui reconnaissent l'Hexagastrine et ses analogues et entraînent le déplacement de la Gastrine marquée qui y est fixée. Ainsi le résidu tyrosyle porteur des atomes d'iode ne ferait pas partie du site antigénique correspondant , ce

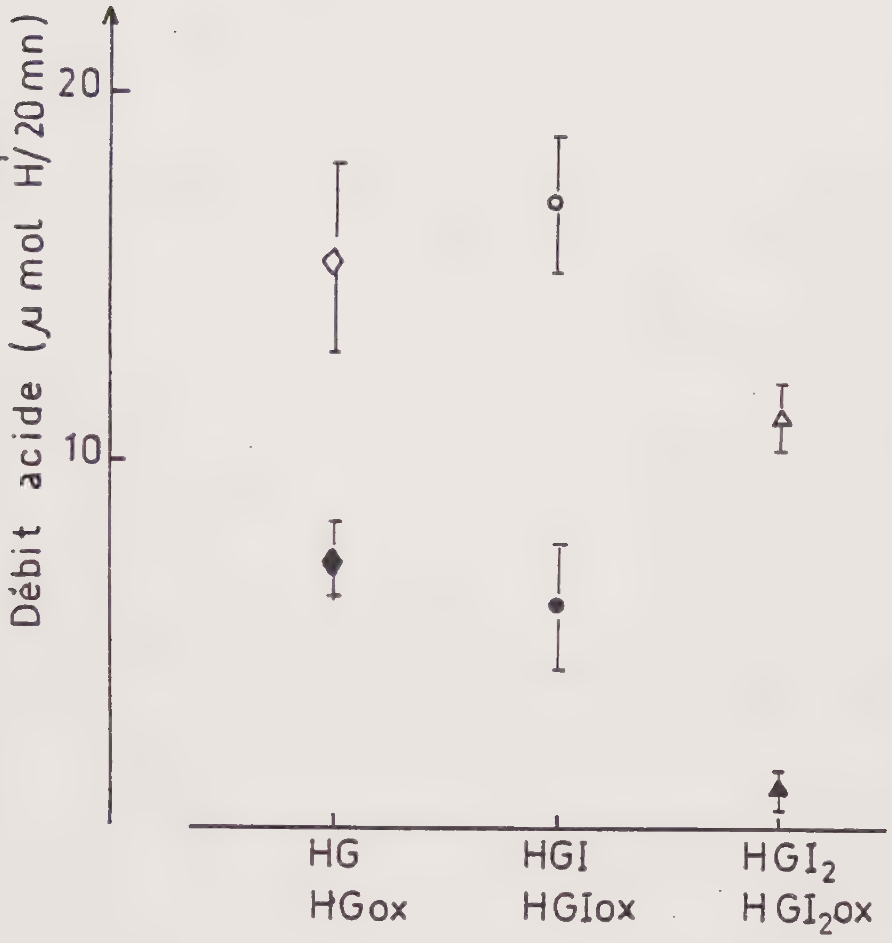


Figure 42 - Réponses secrétoires obtenues par perfusion , à la dose de 5.2 nmol/kg/h des dérivés iodés et/ou oxydés de l'Hexagastrine :

HG (◇) HGI (○) HGI_2 (△)

HGox (◆) HGIox (●) HGI_2ox (▲)

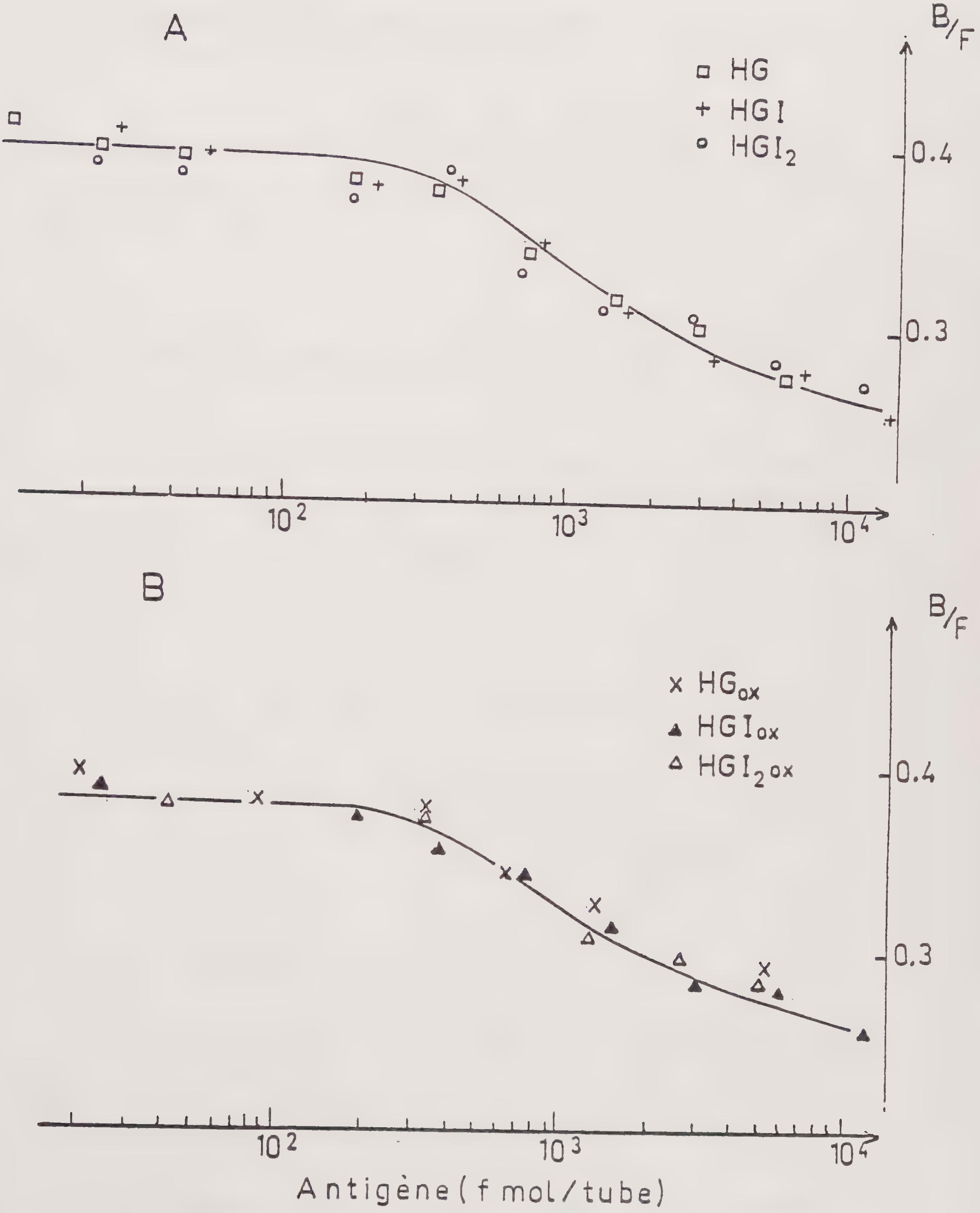


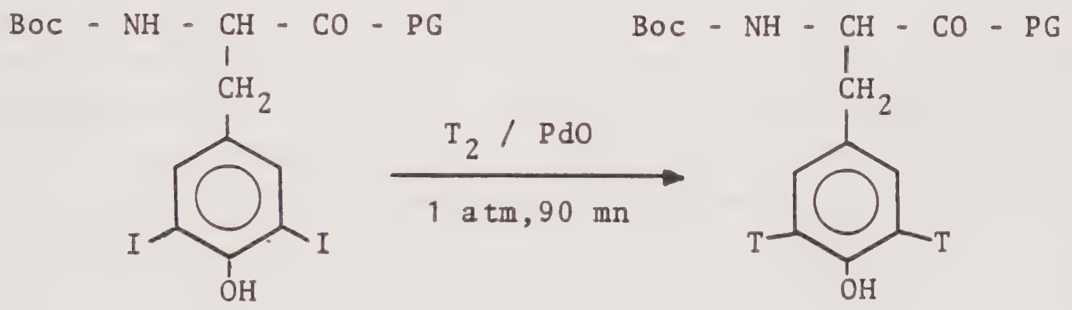
Figure 43 - Courbes de dosages radioimmunologiques de HG (□), HGI (+) et HGI_2(○) (A) et de HGox (×), HGIox (▲) et HGI_2ox (△) (B).

qui expliquerait la non spécificité de reconnaissance des différents analogues iodés par ces anticorps.

Le fait que les dérivés dont la Méthionine est oxydée ne soient pas non plus différenciés par ces dosages, suggère que les anticorps intervenant ne sont pas suffisamment spécifiques de ce résidu.

III.6 - Obtention d'Hexagastrine tritiée (^{3}H-HG)

L'Hexagastrine tritiée a été obtenue par substitution catalytique, sur l'Hexagastrine diiodée, des deux atomes d'iode en position α du groupe phénol de la Tyrosine, par deux atomes de Tritium selon le schéma suivant :



III.6.1 - Tritiation de HGI_2

Une solution de 2 mg (1,7 µmole) de diiodohexagastrine dans 100 µl d'ammoniaque 0,1 M et 900 µl d'éthanol, placée avec un agitateur magnétique dans un petit ballon adaptable au banc de tritiation, est tout d'abord congelée.

On ajoute 20 mg de catalyseur (PdO) et le réacteur est fixé sur l'appareil de transfert de gaz. Un vide poussé est

fait dans tout le circuit .

. Le tritium est ensuite introduit dans le réacteur sous une pression de 0,95 bar. L'échantillon est décongelé doucement et agité pendant 1 h 30 mn. La réaction terminée, on recongèle la solution et le tritium excédentaire est éliminé sous vide. La solution portée à température ambiante est séparée du catalyseur par filtration (Millipore 0,45 µm). Elle est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif et reprise simultanément par 100 ml d'acide acétique 1 % dans H_2O pour enlever tous les hydrogènes labiles. La solution concentrée est conservée avec une petite quantité d'éthanol pour éviter la précipitation du peptide.

III.6.2 - Contrôle par chromatographie sur couche mince

L'obtention d'Hexagastrine tritiée a été contrôlée par chromatographie sur couche mince (Silica Gel 60 F - 254 Merck) en utilisant plusieurs systèmes de solvants de migration. Nous reportons, à titre d'exemple, les résultats obtenus avec le mélange éluant suivant : Ethylacétate - Pyridine - Acide acétique - Eau (60-20-6-11 v/v) (figure 44). La plaque chromatographique a été autoradiographiée et la radioactivité ^3H des taches enregistrée. Le radioenregistrement de la plaque montre bien un pic radioactif majoritaire au même R_f (R_f = 0,68) que l'Hexagastrine témoin révélée par le réactif TMD.

III.6.3 - Purification de ^3H-HG par HPLC

La purification de l'Hexagastrine tritiée a été réalisée par chromatographie HPLC sur une colonne de silice greffée Partisil 10-ODS-2 avec le mélange éluant acétonitrile-tampon triéthylamine phosphate 0,1 M pH 3,5 (45/55) (système HPLC I dans § II.2.4). L'éluat est suivi par un détecteur de densité optique à 280 nm et un détecteur de radioactivité ^3H (figure 45).

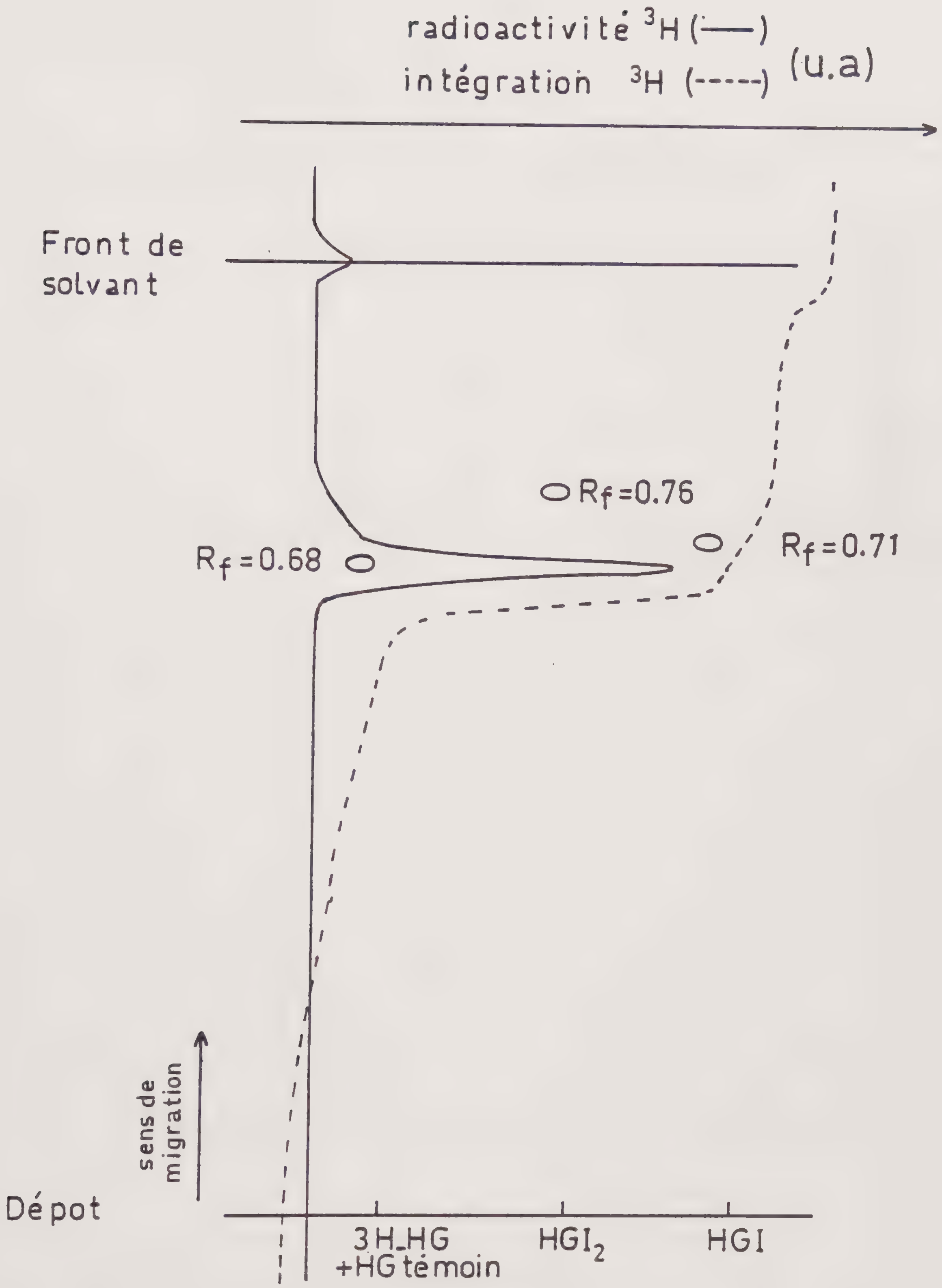
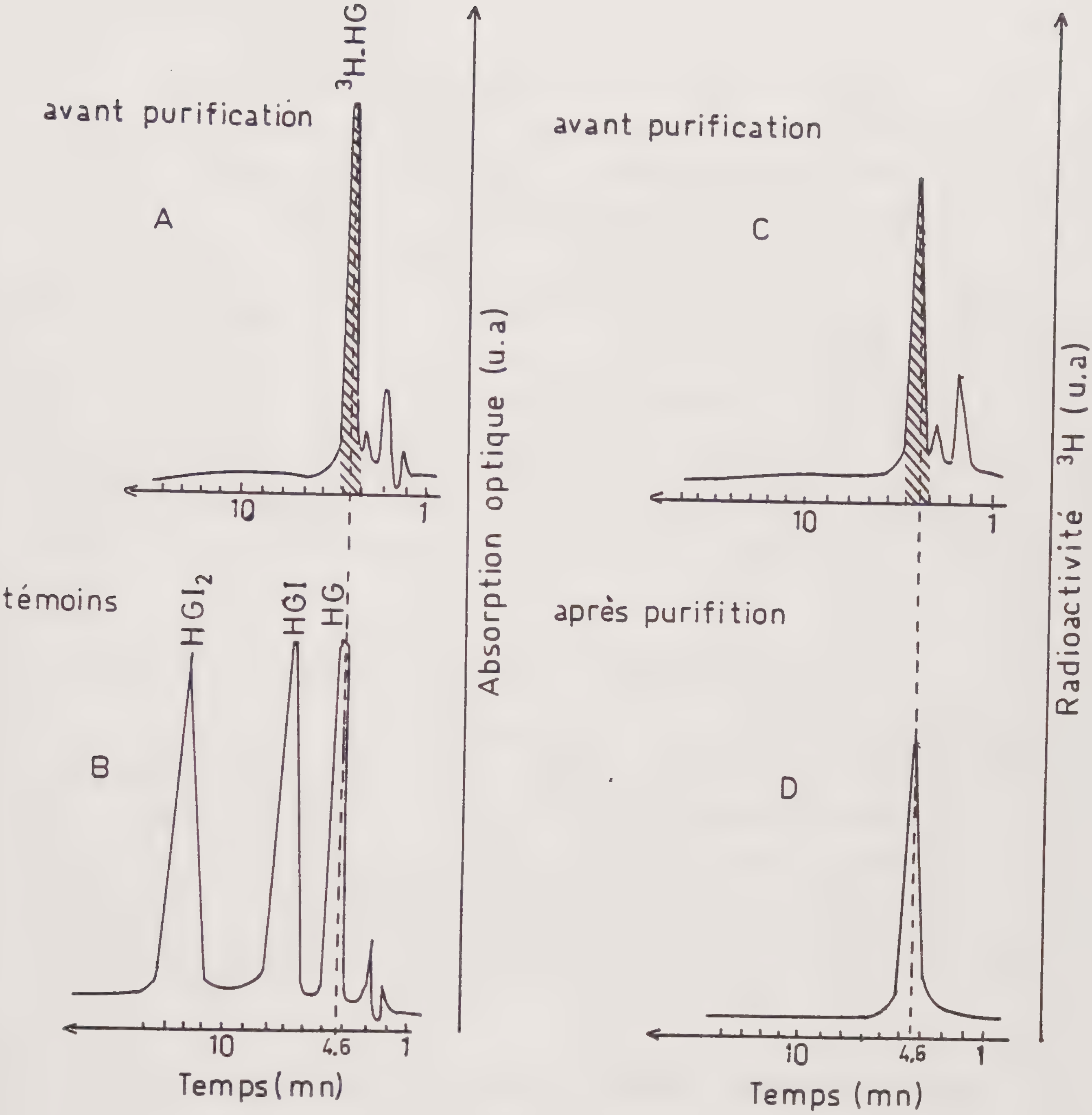


Figure 44 - Chromatographie sur couche mince de Silicagel 60F 254 (Merck) de l'Hexagastrine tritiée avant purification et mesure de la radioactivité ^{3}H .

éluant : Ethylacétate/Pyridine/Acide acétique/Eau: 60/20/6/11

révélateur : TMD



<u>Figure 45</u> - Purification de l'Hexagastrine tritiée sur HPLC analytique Partisil 10-ODS-2 .

éluant : acétonitrile/TEAP 0.1M pH 3.5 (45/55)
débit : 1.2 ml/mn

Le profil d'élution obtenu en absorption optique (figure 45.A) comparé à celui d'un mélange standard d'Hexagastrine, d'Hexagastrine monoiodée et d'Hexagastrine diiodée (figure 45.B) montre que l'Hexagastrine diiodée a complètement réagi et que les deux atomes d'Iode ont bien été substitués par le tritium. Les pics d'absorption (figure 45.A) et de radioactivité (figure 45.C) coïncident bien et correspondent au temps d'élution de l'Hexagastrine témoin. Le profil de radioactivité ^{3}H (figure 45.C) montre également la présence d'un peu de Tritium qui sort dans le volume mort de la colonne. Le pic d'Hexagastrine tritiée (hachuré) est collecté et une partie aliquote est réinjectée sur la colonne. Le profil de radioactivité (figure 45.D) montre alors la pureté du produit collecté.

III.6.4 - Rendement et radioactivité spécifique

D'après le spectre d'absorption de l'Hexagastrine tritiée purifiée nous avons obtenu un rendement global de tritiation de 72 % (rapport molaire par rapport à l'Hexagastrine diiodée de départ) et la mesure de sa radioactivité ^{3}H nous a permis de déterminer une radioactivité spécifique de 45 Ci/mmole. Le rendement élevé obtenu montre que dans l'Hexagastrine le Soufre de la Méthionine n'empoisonne pas le catalyseur d'hydrogénation.

III.6.5 - Activité biologique et dosage radioimmunologique

L'activité biologique de l'Hexagastrine tritiée a été mesurée par injection unique .

La figure 46 montre les résultats obtenus à 3 doses d'Hexagastrine tritiée (1,3 - 5,2 et 20,8 nmoles/kg). On observe bien une secrétion dose-reliée et la comparaison à 5,2 nmoles/kg avec la secrétion stimulée par l'injection de Pentagastrine ou d'Hexagastrine témoin montre que l'activité biologique de la molécule marquée est identique à celle de son homologue non radioactif.

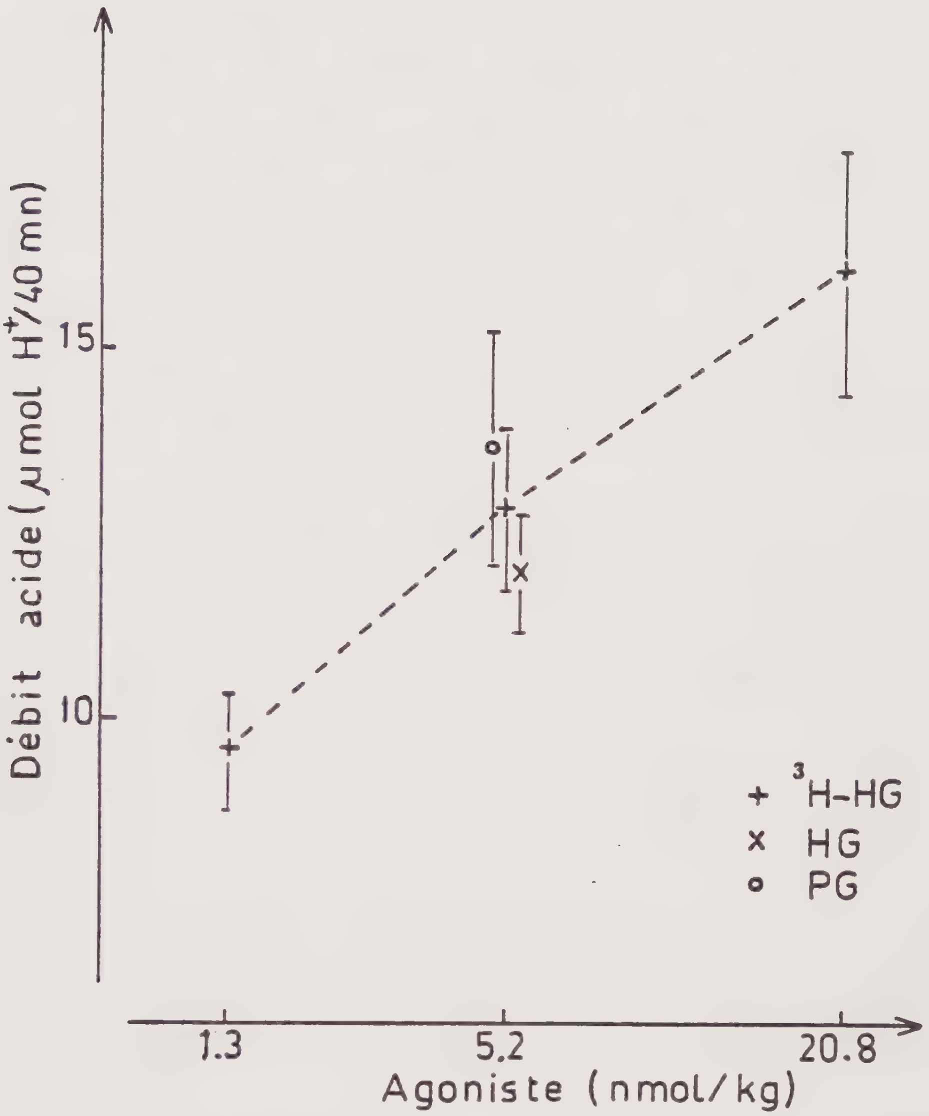


Figure 46 - Courbe dose-réponse de l'Hexagastrine tritiée (+) et comparaison , à la dose 5.2 nmol/kg , des réponses secrétoires de PG (o) , HG (x) et ^{3}H-HG (+) .

De même, les courbes de dosages radioimmunologiques (figure 47) des deux composés Hexagastrine et Hexagastrine tritiée sont identiques et confirme l'analogie de ces deux peptides et l'absence de modification par les traitements successifs.

III.7 - OBTENTION D'HEXAGASTRINE MARQUÉE À L'IODE 125 (^{125}I-HG)

Il existe plusieurs méthodes d'iodation de peptide (ICl / 27 / ; Chloramine T / 45 / ; Lactoperoxydase / 61 / ; Electrolyse / 75 / ; Iodo-gen / 30 /). Des essais préliminaires de marquage à l'Iode 125 de l'Hexagastrine par plusieurs de ces méthodes nous ont conduit dans tous les cas à l'obtention de dérivés oxydés, en raison des résidus Tryptophanyle et Méthionyle très sensibles à l'oxydation et très exposés dans ce peptide.

Dans le cas de la Gastrine (G.17) la méthode la plus employée est celle utilisant la Chloramine T comme agent oxydant. Cette méthode a l'avantage de permettre un rendement de marquage élevé et l'obtention d'une haute radioactivité spécifique.

Nous avons donc voulu l'appliquer à l'Hexagastrine. Cependant, les études précédentes nous ayant montré que l'oxydation et la diiodation de l'Hexagastrine entraînaient une diminution importante de son activité biologique, nous avons recherché les conditions d'iodation par la Chloramine T nécessaires à l'obtention maximale de l'Hexagastrine monoiodée I^{125} non oxydée.

- *Principe d'Iodation par la Chloramine T*

Dans cette méthode, proposée par Hunter et Greenwood / 45 /, le N-chloro-p-méthylbenzènesulfonamide de sodium ou ou Chloramine T, de formule :

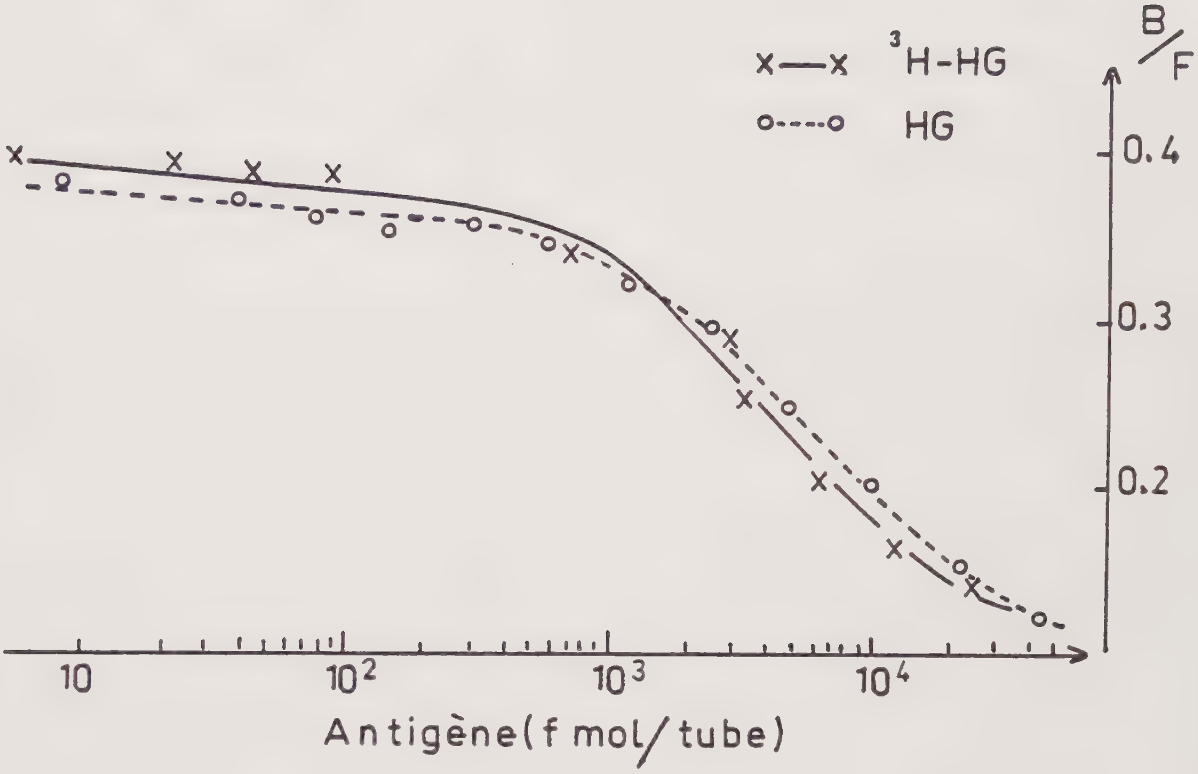
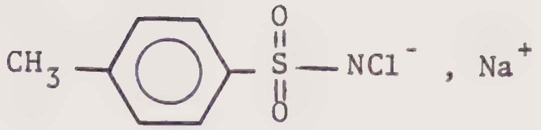


Figure 47 - Courbe de dosage radioimmunologique de l' Hexagastrine tritiée (x——x) et de l'Hexagastrine (o---o) .

(anticorps anti-G.17)

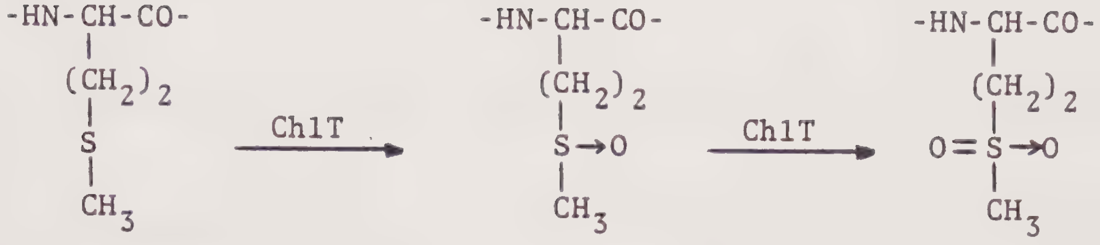


se décompose dans l'eau en formant de l'acide hypochloreux HOCl qui oxyde l'iodure radioactif en une forme chargée H_2OI^+. Cette forme "active" réagit à son tour avec le groupement phénolique des résidus tyrosyles par substitution électrophile, ce qui permet d'introduire, selon les cas, 1 ou 2 atomes d'Iode en position *α* du OH du cycle aromatique.

La Chloramine T se dissociant lentement, la réaction d'oxydation est progressive et permet en principe de générer l'entité I^+ sans accumulation d'autres formes oxydantes, et par conséquent de minimiser les réactions secondaires .

Dans le cas de la Tyrosine isolée les pK des dérivés mono et diiodé sont respectivement 8,2 et 6,36 / 25 /. Un milieu basique serait donc favorable à la formation du dérivé monoiodé, mais à pH alcalin la Chloramine T ne se dissocie plus en acide hypochloreux HOCl. D'après différents auteurs / 31, 81 /, le pH optimal d'iodation par la Chloramine T se situe entre 7,00 et 7,5. Pour maximiser la formation du dérivé monoiodé nous nous sommes donc fixé un pH de 7,5 dans le milieu réactionnel.

Dans le cas de peptides un autre problème posé par l'utilisation de la Chloramine T est celui de l'oxydation par l'acide hypochloreux d'acides aminés tels que la Méthionine et le Tryptophane, selon le pH du milieu. En milieu acide ces deux résidus sont oxydés / 76 / tandis que dans les conditions d'iodation utilisées, c'est-à-dire à pH neutre ou légèrement alcalin, seuls les résidus Méthionyles sont oxydés par la Chloramine T / 70, 16, 76 / qui les transforme en leurs dérivés sulfoxydes (I) ou sulfones (II) :



I II

Méthionine — Méthionine sulfoxyde — Méthionine sulfone

Malgré les problèmes posés par la Chloramine T, son utilisation est encore préférée pour sa commodité d'emploi et la haute radioactivité spécifique qu'elle permet d'obtenir.

L'oxydation ou les effets secondaires non désirés qu'elle peut entraîner , peuvent être réduits en utilisant des conditions judicieuses d'expérimentation.

Ainsi dans le cas de l'iodation de la Gastrine, Stadil / 83 / a proposé de diminuer la quantité de Chloramine T utilisée dans la méthode de Hunter et Greenwood pour réduire l'oxydation du résidu Méthionyle contenu dans cette hormone et limiter l'avancement de la réaction.

Toujours pour éviter l'oxydation de la Méthionine, Morley / 84, 65 / a préconisé également d'ajouter dans le milieu réactionnel du Diméthylsulfoxyde (DMSO), réducteur doux qui peut être oxydé en compétition avec la Méthionine par la Chloramine T / 59 /.

Dans le cas de l'Hexagastrine qui possède également le résidu Méthionine, nous avons voulu appliquer les conditions précédentes pour obtenir le dérivé monoiodé non oxydé.

- *Marquage à l'Iode 125 de l'Hexagastrine par la Chloramine T*

Trois essais ont été réalisés dans les trois conditions préconisées dans la littérature pour l'iodation de la Gastrine et relatées ci-dessus.

L'Iode 125 dont on dispose est sous forme d'iodure de sodium , en solution sodique à pH 7-11,et dépourvue d'agent réducteur.

L'hexagastrine dissoute par du Diméthylformamide a été additionnée successivement d'Iode 125, éventuellement de DMSO, et de Chloramine T en milieu tampon phosphate 0,25 M pH 7,5, puis, après 30 s, la réaction a été arrêtée par un excès de métabisulfite de sodium (10 équivalents par rapport à la Chloramine T). Les différents produits obtenus ont été identifiés par HPLC (systèmes I et II) et leurs pourcentages respectifs calculés d'après la radioactivité I^{125} des fractions collectées toutes les minutes en sortie de colonne.

Les conditions de réaction et les résultats obtenus pour chacun des trois essais réalisés sont reportés dans le tableau ci-dessous. Les quantités des différents réactifs sont exprimées en équivalents molaires par rapport à l'Hexagastrine.

D'après les résultats de l'essai n° 1, l'utilisation d'un large excès de Chloramine T par rapport à l'hormone selon les méthodes décrites par Hunter et Greenwood / 45 / et Mac Guigan / 40 / conduit effectivement à l'obtention des composés oxydés uniquement.

N° essai	Produits réactionnels (équivalents molaires)					% radioactivité I^{125} des pics HPLC				
	HG	NaI^{125}	DMSO	ChlT	(HG) réactionnelle M/L	Iode non fixé	HGIox	HGI_2ox	HGI	HGI_2
1	1 1,55 nmole	0,32	-	9 0	$1,1.10^{-5}$	50	45	5	0	0
2	1 2,3 nmoles	0,24	-	8,4	$6,3.10^{-5}$	72	28	0	0	0
3	1 3,1 nmoles	0,87	700 000	8,3	$1,7.10^{-5}$	100	0	0	0	0

En réduisant le rapport ChlT/HG à 8,4 ainsi que le préconisent Stadil et Rehfeld / 83 / nous avons éliminé le dérivé diiodé oxydé mais le dérivé monoiodé est toujours oxydé (essai n° 2).

Quant à l'addition de DMSO dans les rapports conseillés par Morley / 84, 65 / (50 µl/nmole de peptide) pour diminuer l'oxydation de la Méthionine, le résultat de l'essai n° 3 montre que, dans le cas de l'Hexagastrine, elle bloque totalement la réaction d'iodation.

Afin de mettre au point les conditions optimales d'obtention de l'Hexagastrine monoiodée non oxydée, il était donc nécessaire de réexaminer les différents paramètres (rapport des réactifs, concentrations, effet protecteur du DMSO, ...). Nous avons réalisé cette étude avec de l'Iode non radioactif et pour pouvoir alors détecter par absorption optique les diffé-

rents composés formés ou restant après iodation, nous avons utilisé une quantité d'Hexagastrine de départ 10 à 20 fois plus importante que dans le cas de ces marquages radioactifs.

III.7.1 - Iodation de l'Hexagastrine par l' Iode 127 (non radioactif)

III.7.1.1 - Sans protection par le DMSO

L'effet de l'augmentation du rapport Chloramine T/ Peptide sur le pourcentage des différents composés obtenus a été étudié pour plusieurs valeurs de rapport NaI/Hexagastrine.

- *Mode opératoire*

A une solution de 40 nmoles d'Hexagastrine HG (PM = 931) dissoutes dans 40 µl de mélange Diméthylformamide-H_2O (50-50), on ajoute de l'iodure de sodium dans des rapports NaI/HG de 0,25 - 0,5 - 1 - 2 et de Chloramine T en quantités croissantes (ChlT/NaI = 0,5 - 1 - 2 - 4) pour chacun de ces rapports, dans un volume final de 90 µl de tampon phosphate 0,5 M pH 7,6. La concentration réactionnelle de l'Hexagastrine est alors de $4,3.10^{-4}$ M/L.

Après 1 mn d'agitation au vortex à température ambiante la réaction est arrêtée par 16 µl de métabisulfite de sodium 1/10 (467 nmoles).

Le mélange réactionnel est alors analysé par HPLC analytique µ-Bondapak C18 (système VI). Les pourcentages des différents composés obtenus sont déterminés d'après l'intégration des pics d'absorption à 280 nm, l'Hexagastrine et ses dérivés iodés oxydés ou non ayant même coefficient d'extinction molaire à cette longueur d'onde ($\varepsilon_{280\ nm}$ = 7 250 $cm^{-1}.mole^{-1}.l$).

Les résultats obtenus sont reportés sur la figure 48.

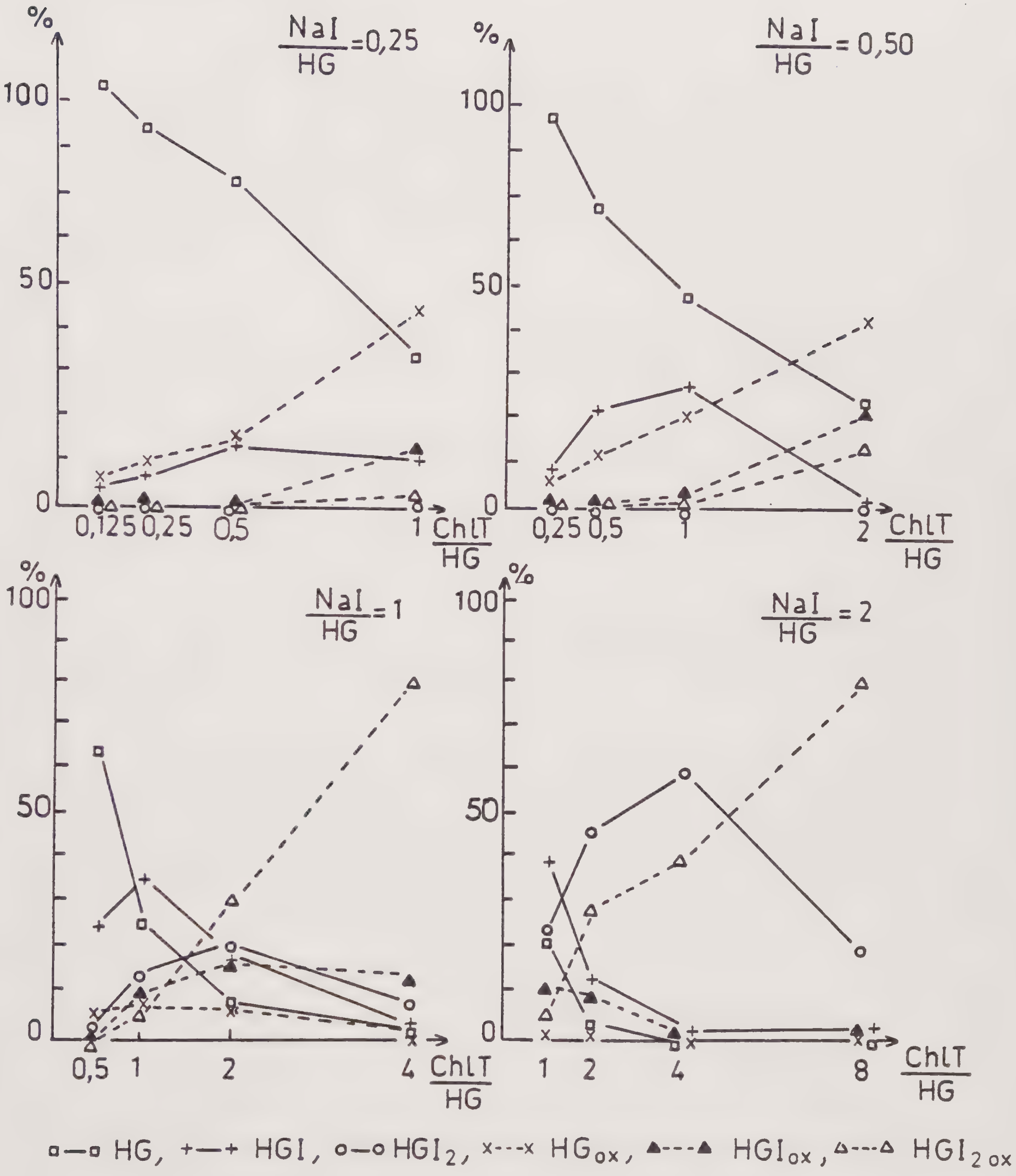


Figure 48 - Pourcentages d ' Hexagastrine et de formation de ses dérivés oxydés et/ou iodés en fonction de la quantité de Chloramine T utilisée pour différents rapports NaI/HG (0.25,0.5,1,2) .

Sur les 16 cas étudiés on peut tout d'abord noter que les pourcentages des divers dérivés obtenus lors de l'iodation de l'Hexagastrine dépendent bien à la fois des quantités de NaI et de celle de Chloramine T utilisées . Dans tous les cas le taux de transformation de HG augmente avec la concentration de la Chloramine T.

Lorsque la quantité de Chloramine T est proche de celle de HG, le rendement du produit recherché (HGI) est optimum.

Lorsque la concentration de ChlT dépasse celle de HG le produit majoritaire formé est HGox si NaI/HG < 1, alors que pour NaI/HG > 1 les principaux produits formés sont de l'Hexagastrine diiodée oxydée et non oxydée .

Parmi les cas étudiés les meilleurs pourcentages de HGI ont été obtenus avec les rapports molaires HG-NaI-ChlT = 1-1-1 (36 % HGI) et 1-2-1 (39,5 % HGI).

Pour diminuer la quantité de produits oxydés ou diiodés formés dans ces conditions et qui peuvent gêner une bonne séparation (purification par HPLC) du produit observé, nous avons voulu protéger l'Hexagastrine de l'oxydation et de la diiodation par la présence de Diméthylsulfoxyde.

III.7.1.2 - En présence de DMSO

L'influence du DMSO a été étudiée dans le cas des rapports HG-NaI-ChlT = 1-2-1 et 1-1-1 où l'on obtient les meilleurs rendements de HGI et des rapports 1-2-2 et 1-1-2 où l'on s'attend à une diminution des composés diiodés oxydés ou non en faveur de HGI.

Cette étude a été faite dans des conditions expérimentales parfaitement identiques à celles de l'étude précédente, le Diméthylsulfoxyde étant simplement ajouté au milieu réactionnel avant l'addition de la Chloramine T.

Les résultats obtenus dans ces quatre cas sont représentés respectivement sur les figures 49.A, 49.B, 49.C, 49.D. Ces figures montrent que des quantités croissantes de DMSO entraînent dans tous les cas une diminution des produits oxydés. Dans les cas A et B on peut également observer une nette diminution du dérivé diiodé.

Pour le rapport optimal (HG-NaI-ChlT : 1-2-1) l'addition de DMSO dans un rapport molaire DMSO/HG compris entre 3 500 et 7 000, permet d'obtenir l'Hexagastrine monoiodée, avec un rendement d'environ 50 %, en l'absence de tout dérivé oxydé ou diiodé. Seule l'Hexagastrine native qui n'a pas réagi reste dans le milieu réactionnel et peut facilement être séparée par HPLC de l'Hexagastrine monoiodée.

Dans la même ligne de pensée nous avons également étudié l'effet dû à la présence dans le milieu réactionnel de Méthionine libre qui peut être oxydée par la Chloramine T compétitivement avec le résidu Méthionyle de l'Hexagastrine, comme le DMSO. La figure 50 montre les résultats obtenus dans le cas du rapport HG-NaI-ChlT : 1-2-1, dans les mêmes conditions que précédemment, le DMSO étant remplacé par la Méthionine libre : avec une faible quantité de Méthionine on évite la formation des produits secondaires mais le pourcentage d'Hexagastrine monoiodée obtenu n'est pas amélioré. On peut également remarquer qu'à quantité équimolaire de Méthionine et de peptide, il n'y a plus réaction d'iodation, ce qui suggère que la Méthionine est oxydée plus rapidement que le résidu Tyrosyle n'est iodé. Nous avons également obtenu des résultats similaires dans les trois autres cas (rapports HG-NaI-ChlT : 1-1-1, 1-2-2, et 1-1-2).

Concernant l'influence du temps de réaction sur les rendements respectifs des produits formés dans le cas des rapports molaires HG-DMSO-NaI-ChlT : 1-3500-2-1, nous n'avons observé aucune variation quelque soit le temps de réaction entre 30 s et 5 mn.

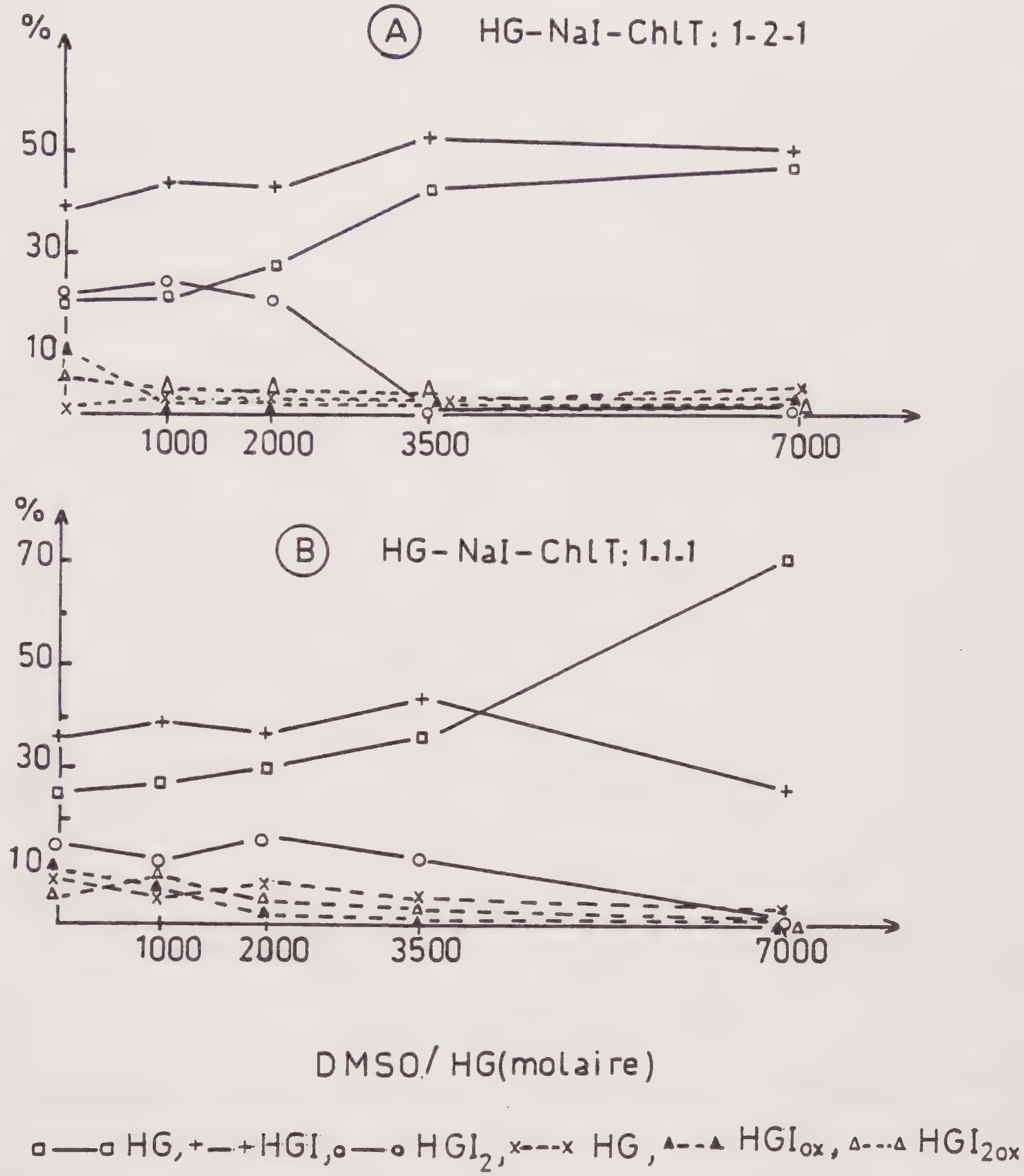


Figure 49 - Influence du DMSO sur la formation des dérivés iodés et/ou oxydés de l'Hexagastrine dans les conditions : HG-NaI-ChlT = 1-2-1 (A) ou 1-1-1 (B) (rapports molaires)

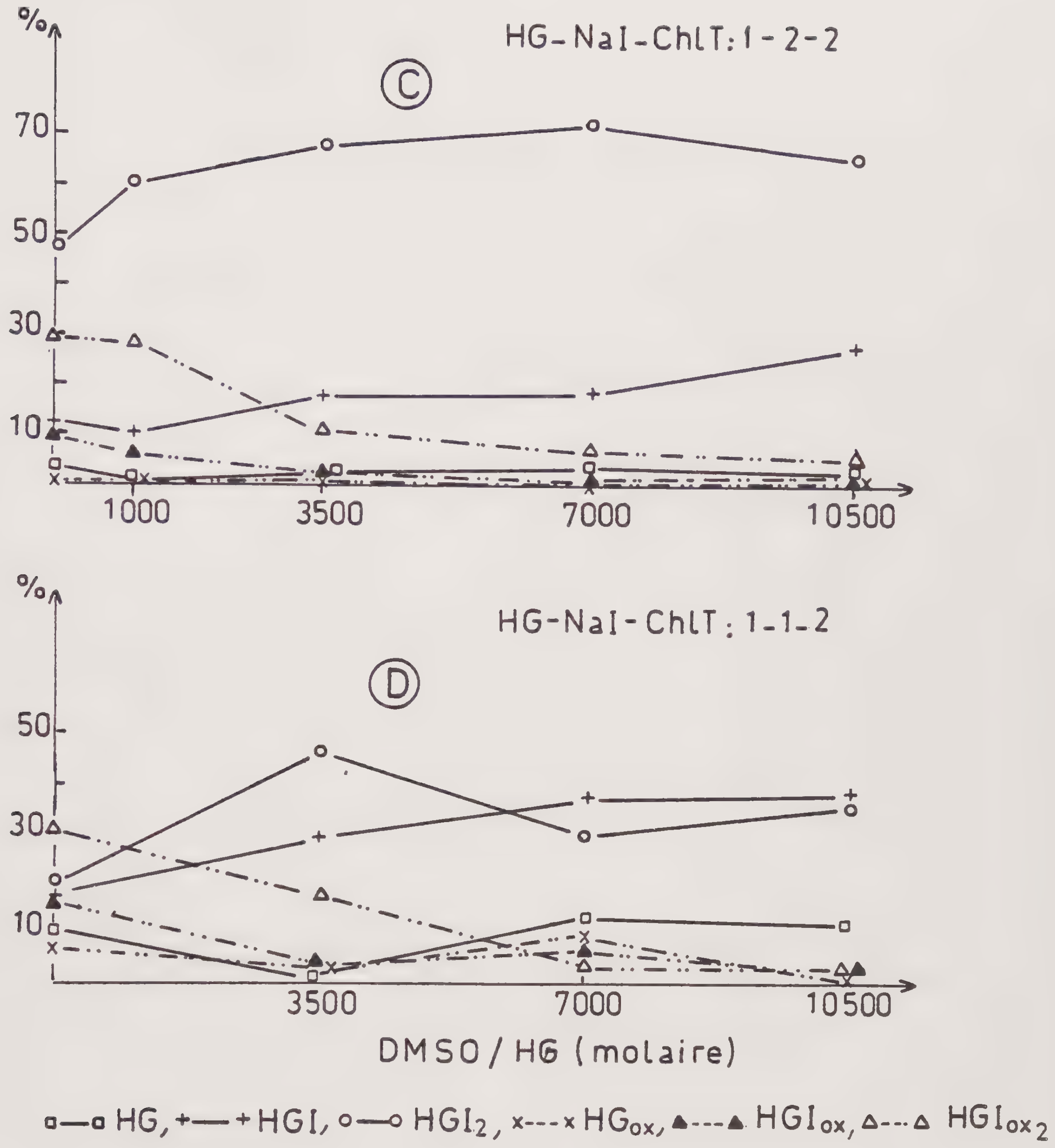


Figure 49 (suite) - Influence du DMSO sur la formation des dérivés iodés et/ou oxydés de l'Hexagastrine dans les conditions : HG-NaI-ChlT = 1-2-2 (C) ou 1-1-2 (D) (rapports molaires) .

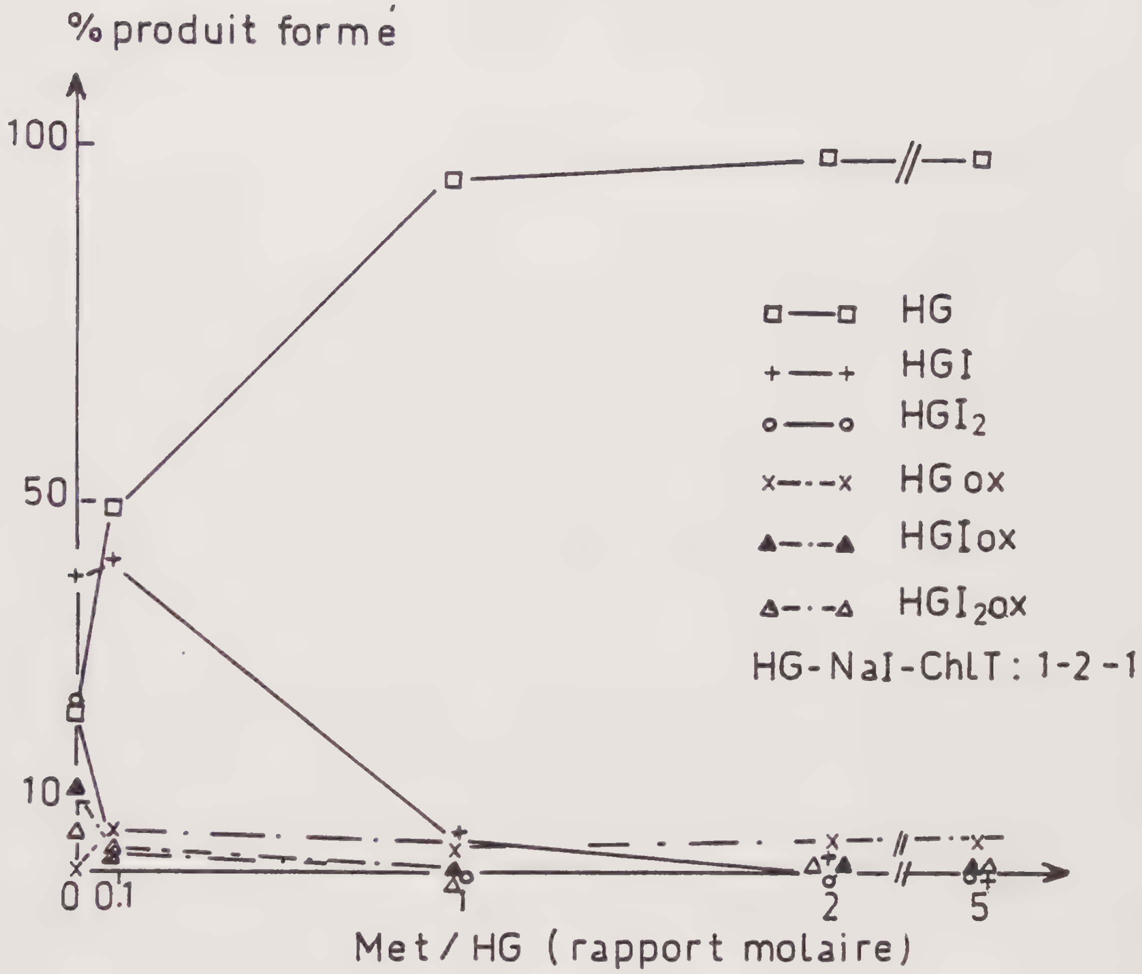


Figure 50 - Pourcentages de formation des différents dérivés iodés et/ou oxydés de l'Hexagastrine (40 nmoles/90 µl pH 6) en fonction de la quantité de Méthionine libre ajoutée dans le milieu .

III.7.2 - Marquage radioactif de l'Hexagastrine à l'Iode 125

Nous avons alors voulu appliquer au marquage radioactif les meilleures conditions de formation de HGI obtenues par cette étude à froid, c'est-à-dire l'addition des différents réactifs dans les rapports molaires suivants : HG-DMSO-NaI-ChlT : 1-3500 à 7000-2-1 .

Nous avons donc utilisé le protocole suivant :

A 1,2 nmole d'Hexagastrine dissoute dans 6 µl de DMF/H_2O (50/50) on ajoute 6 µl de DMSO 1/10 (8,4 µmoles : 7000 équivalents HG) et 2,4 nmoles de NaI^{125} (4 mCi), 1,2 nmole de Chloramine T sont alors additionnées au mélange réactionnel et la solution est agitée pendant 1 mn. La réaction est ensuite arrêtée par 12 nmoles de métabisulfite de sodium. Le volume réactionnel étant de 35,5 µl de tampon phosphate 0,5 M pH 7,6, la concentration en peptide est de $3,4.10^5$ M/L.

L'analyse du mélange réactionnel par HPLC et comptage de la radioactivité ^{125}I de l'éluat nous a montré que le rendement de marquage sur cette faible quantité de peptide était pratiquement nul dans ces conditions expérimentales. Ce résultat nous a alors conduit à étudier de nouveau l'influence des concentrations et des quantités de réactifs présents, en particulier celle de l'Hexagastrine.

En effet, nous remarquons qu'entre l'étude effectuée à froid et cet essai radioactif, il existe une différence sensible de quantité (d'environ 40 à 2 nmoles) et de concentration réactionnelle (d'environ 5.10^{-4} à 5.10^{-5} M/L) d'Hexagastrine utilisée. Il est donc possible que l'un de ces facteurs soit à l'origine du résultat négatif obtenu avec ce marquage malgré l'utilisation des meilleures conditions déterminées à froid.

Cette nouvelle étude a donc été réalisée tout d'abord en utilisant 3 à 5 µCi de NaI^{125} comme traceur pour mettre au

point de nouvelles conditions opératoires qui ont été ensuite appliquées à une quantité importante d'Iode radioactif (3 mCi).

III.7.2.1 - Essais avec traceur

Nous avons tout d'abord utilisé une quantité d'Hexagastrine de 2 nmoles, 1,86 ng, à une concentration de 5.10^{-5} M/L, qui sont les conditions du marquage à chaud. Les rapports des différents constituants et les résultats obtenus à chaque essai sont donnés dans le Tableau 13.

La diminution de la quantité de DMSO par rapport à l'essai effectué à chaud (HG-NaI-DMSO-ChlT : 1-2-7000-1) n'entraîne pas d'amélioration du rendement de marquage (cas 1). En augmentant la quantité de ChlT et le rapport ChlT/NaI (cas 2) ou ne favorise pas plus l'iodation même en l'absence de DMSO (cas 3). Par contre, une augmentation sensible du rapport ChlT/NaI, pour une faible quantité de NaI, ce qui correspond aux conditions préconisées par Stadil et Rehfeld / 1 / (cas 4) nous donne un pourcentage élevé d'iodation mais l'Hexagastrine monoiodée formée est oxydée. La même expérience en présence de DMSO (cas 5) diminue le pourcentage obtenu précédemment mais toujours sans donner d'Hexagastrine mono iodée. Nous avons alors diminué le taux de ChlT sans changer la quantité d'iode. Cela nous a conduit de nouveau à de faibles rendements de marquage, en présence ou non de DMSO (cas 6 et 7).

Il nous a donc semblé nécessaire d'utiliser une quantité plus importante d'Hexagastrine, c'est-à-dire 40 nmoles comme dans les essais à froid qui nous avaient donné les meilleurs résultats, mais en diluant à la concentration de 5.10^{-5} M/L.

Les données (rapports réactionnels et résultats obtenus) relatives à ces conditions sont rapportées dans le Tableau 14.

TABLEAU 13

Pourcentage des dérivés iodés radioactifs formés pour différents rapports molaires de réactifs en partant d'une quantité d'Hexagastrine de 2 nmoles à 5.10^{-5} M/1

N° cas	Produits réactionnels (équivalents molaires)				% radioactivité I^{125} Systèmes HPLC III et IV				
	HG	NaI	DMSO	ChlT	Iode non fixé	HGIox	HGI	HGI_2ox	HGI_2
1	1	2	3500	1	100	-	-	-	-
2	1	0,5	3500	2	96	3	1	-	-
3	1	0,5	0	2	96	2	1	1	-
4	1	0,066	0	8	27	65	-	8	-
5	1	0,066	3500	8	39	41	-	20	-
6	1	0,066	3500	0,264	90	6	4	-	-
7	1	0,066	0	0,264	94	4	2	-	-

TABLEAU 14

Pourcentage des dérivés iodés radioactifs formés pour différents rapports molaires de réactifs en partant d'une quantité d'Hexagastrine de 40 nmoles à 5.10^{-5} m/l

N° cas	Produits réactionnels (équivalents molaires)				% radioactivité I^{125} Systèmes HPLC III et IV				
	HG	NaI	DMSO	ChlT	Iode non fixé	HGIox	HGI	HGI_2ox	HGI_2
8	1	2	3500	1	92	4	1,7	1,8	0,5
9	1	0,5	3500	1	87	7	5,5	0,5	-
10	1	0,066	0	0,264	98,5	1	0,5	-	-
11	1	0,066	0	8	15,5	71	7,2	8,3	-
12	1	0,066	3500	8	17	70	6	7	-

En reprenant les rapports les plus favorables d'après les essais à froid (cas 8) le taux de marquage est encore très faible même en augmentant le rapport ChlT/NaI (cas 9). En multipliant encore par 2 le rapport ChlT/NaI et sans DMSO nous n'avons pas obtenu d'amélioration du taux de marquage (cas 10) (la faible quantité d'iode employée dans cet essai sera effectivement utilisée dans le cas où $Na^{125}I$ pur sera utilisé et non plus seulement en tant que traceur comme pour cette étude; la radioactivité spécifique élevée de l'Iode 125 limite alors ses quantités manipulables lors de marquage à chaud). Par contre, en augmentant fortement la quantité de Chloramine T nous avons obtenu un marquage important mais donnant presqu'essentiellement le dérivé monoiodé oxydé (cas 11), même en présence de DMSO (cas 12).

Nous avons poursuivi nos essais sur 40 nmoles d'Hexagastrine en ramenant sa concentration à 5.10^{-4} M/L (Tableau 15). Une faible quantité de NaI est utilisée en prévision du marquage radioactif où cette quantité est imposée, comme nous l'avons dit précédemment, par la radioactivité manipulable.

Avec un rapport ChlT/NaI de 40 au lieu de 120, nous obtenons des résultats du même ordre de grandeur que dans le cas 12 , avec ou sans DMSO (cas 13 et 14). En conservant le DMSO et en prenant un rapport ChlT/NaI de 20, le marquage est pratiquement identique (cas 15). Mais en poursuivant la diminution de ce rapport nous obtenons enfin un pourcentage important du produit désiré, l'Hexagastrine monoiodée (cas 16), pourcentage que nous avons porté à près de 50 % (en radioactivité incorporée) par l'augmentation de DMSO (cas 17).

Les conditions optimales pour un marquage radioactif ont donc été obtenues avec les rapports suivants :

HG-NaI-DMSO-ChlT : 1-0,025-7000-0,25

en utilisant un grand excès d'hexapeptide à la concentration de 5.10^{-4} M/L.

TABLEAU 15

Pourcentage des dérivés iodés radioactifs formés pour différents rapports molaires de réactifs en partant d'une quantité d'Hexagastrine de 40 nmoles à 5.10^{-4} m/l

N° cas	Produits réactionnels (équivalents molaires)				% radioactivité I^{125} Systèmes HPLC III ou IV				
	HG	NaI	DMSO	ChlT	Iode non fixé	HGIox	HGI	HGI_2ox	HGI_2
13	1	0,025	0	1	12,8	77,4	6,8	3	-
14	1	0,025	3500	1	13,3	73,4	9,1	4,2	-
15	1	0,025	3500	0,5	11	73,5	7	8,5	-
16	1	0,025	3500	0,25	47,2	17,9	34,1	-	0,8
17	1	0,025	7000	0,25	16,1	30,6	49,9	-	3,4

III.7.2.2 - Marquage

Nous les avons appliquées au marquage de 70 nmoles d'Hexagastrine selon le mode opératoire suivant :

66 µg d'Hexagastrine (71,2 nmoles) dissoutes dans 85 µl de mélange Diméthylformamide : tampon phosphate pH 7,00 (1:2) sont additionnées de 3 mCi de NaI^{125} (1,8 nmoles dans 38,2 µl solution sodique) en présence de 540 nmoles de DMSO dans 71,2 µl de tampon phosphate 0,2 M pH 7,4. 17,8 nmoles de Chloramine T (5 µg) sont alors ajoutées au mélange réactionnel. Après 1 mn d'agitation au vortex la réaction est arrêtée par 835 nmoles (159 µg) de métabisulfite de sodium.

- *Purification*

Le mélange réactionnel est alors déposé sur une cartouche de silice greffée SEP-PAK-C18. Après 3 lavages par 1 ml H_2O pour séparer l'iode non incorporé, soluble en milieu aqueux, le mélange de dérivés iodés est élué par 3ml de Méthanol.

La solution obtenue est ensuite concentrée à faible volume (400 µl MeOH) et injectée sur colonne HPLC Partisil-10 ODS-2 analytique où les différents composés iodés sont séparés et collectés (système III).

La mesure de la radioactivité de chaque fraction nous a permis de calculer les résultats ainsi obtenus :

Iode non incorporé	$HGI^{125}ox$	HGI^{125}
25 %	29 %	46 %

L'étude des meilleures conditions d'obtention de mono-iodo I^{125}-Hexagastrine nous a donc permis de synthétiser cet analogue de la Pentagastrine à haute radioactivité spécifique (≅ 1 000 Ci/mmole).

Ce peptide fortement radioactif et possédant toute l'activité biologique et radioimmunologique de l'Hexagastrine permet alors d'étudier sa distribution tissulaire et son métabolisme.

III.7.3 - Etude de la distribution tissulaire de la monoiodohexagastrine ^{125}I in vivo chez le rat entier

La possibilité de synthétiser une quantité importante d'Hexagastrine marquée à l'Iode 125 nous a permis d'aborder sa distribution tissulaire et son métabolisme et de les comparer à ceux de la Gastrine G.17 iodée.

La distribution du peptide radioactif dans les différents tissus est visualisée par une technique scintigraphique. L'appareil utilisé se compose pour l'essentiel, d'une chambre d'ionisation / 74 / qui transforme le rayonnement gamma émis par l'iode radioactif en étincelles, celles-ci impressionnant une plaque photographique polaroïd.

Cette distribution a été étudiée chez des rats mâles Wistar de 300 g ayant suivi pendant 3 semaines un régime sans iode. Avant l'expérience ils sont maintenus à jeûn pendant 20 heures avec libre accès à l'eau et sont anesthésiés et opérés selon la même technique que pour les mesures d'activité biologique. L'animal est alors placé sur le dos le plus près possible du collimateur du scintigraphe.

Après injection intraveineuse de peptide radioactif (200 µCi) on suit pendant 80 minutes la distribution de la radioactivité par des prises de vues successives avec des temps de pose de 5 minutes.

10 minutes après l'injection l'estomac est lavé en continu par du sérum physiologique (soluté NaCl 9 °/₀₀) et la secrétion gastrique entraînée par le sérum de lavage est collectée par fractions de 10 minutes et analysée : on dose, d'une part, l'acidité de ces fractions, ce qui permet de suivre l'activité biologique stimulée par le peptide injecté, et on analyse, d'autre part, ces fractions par HPLC afin d'identifier les produits radioactifs secrétés.

III.7.3.1 - Analyse scintigraphique

Les images scintigraphiques à différents temps après injection intraveineuse de l'Hexagastrine monoiodée (200 µCi, ∿ 100 ng, 0,1 nmole) sont représentées sur la figure 51.

Pendant les 10 premières minutes qui suivent l'injection on observe nettement l'image d'un seul organe : l'estomac.

Cette image conserve la même intensité pendant 20 minutes après le début du lavage par le sérum physiologique puis s'estompe graduellement.

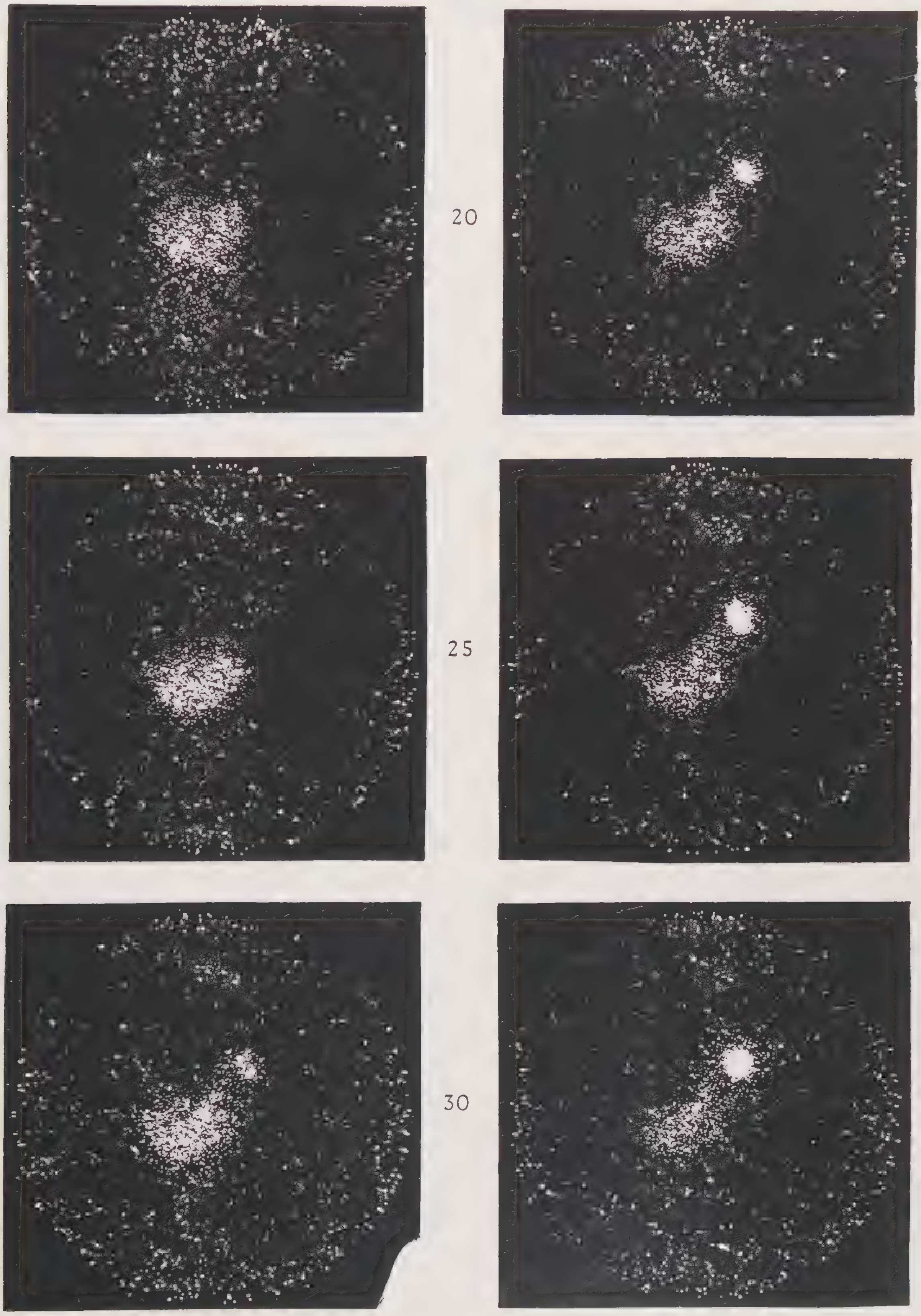
La tache de radioactivité persistante à la partie supérieure droite de l'estomac est due à un mauvais positionnement du cathéter d'évacuation qui s'est déplacé au cours de l'expérience et qui, en contact avec la paroi stomacale, empêche le lavage de cette partie du tissu. Il ne faut donc pas en tenir compte dans l'interprétation de la fixation tissulaire.

On peut remarquer qu'aucune fixation de radioactivité n'a été observée au cours de l'expérience ni sur les reins ni sur la vessie et que la thyroïde n'apparaît sur les images photographiques que faiblement et à partir de la 45ème minute seulement .

Les images scintigraphiques obtenues après l'injection de 200 µCi d'Hexagastrine monoiodée (I^{125}) oxydée synthétisée

<u>Figure 51</u> - Distribution de la radioactivité γ chez le rat entier après injection de monoiodohexagastrine ^{125}I .

Temps mn	Temps mn
5	20
10	25
15	30



Temps mn

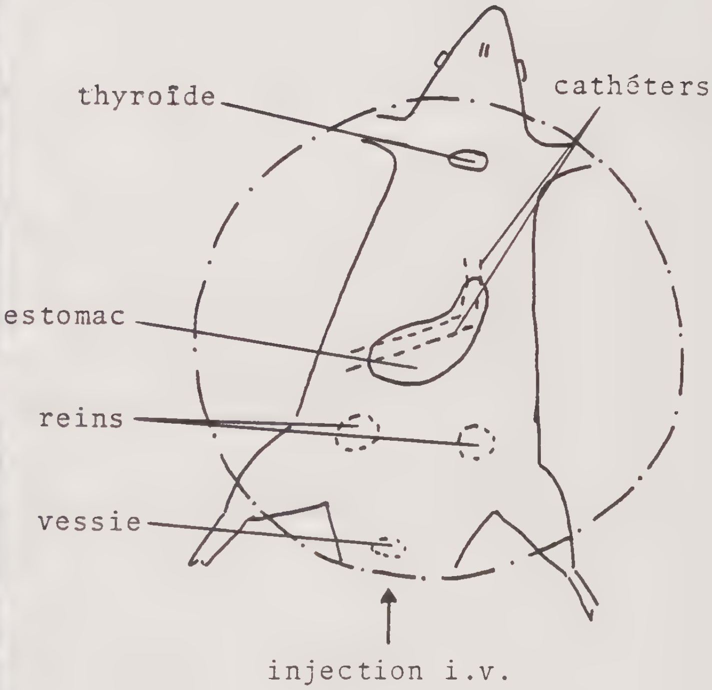
35

Temps mn

70

40

50



parallèlement à HGI^{125} montrent également une fixation de radioactivité essentiellement sur l'estomac dès le début de l'expérience et se maintenant à intensité constante pendant 1 heure (sans lavage).

III.7.3.2 - Analyse de la secrétion gastrique

La secrétion gastrique recueillie par 4 fractions de 10 minutes à partir du début du lavage de l'estomac a été analysée par dosage de l'acide chlorhydrique qu'elle contenait et par l'analyse chromatographique sur colonne HPLC des composés présents.

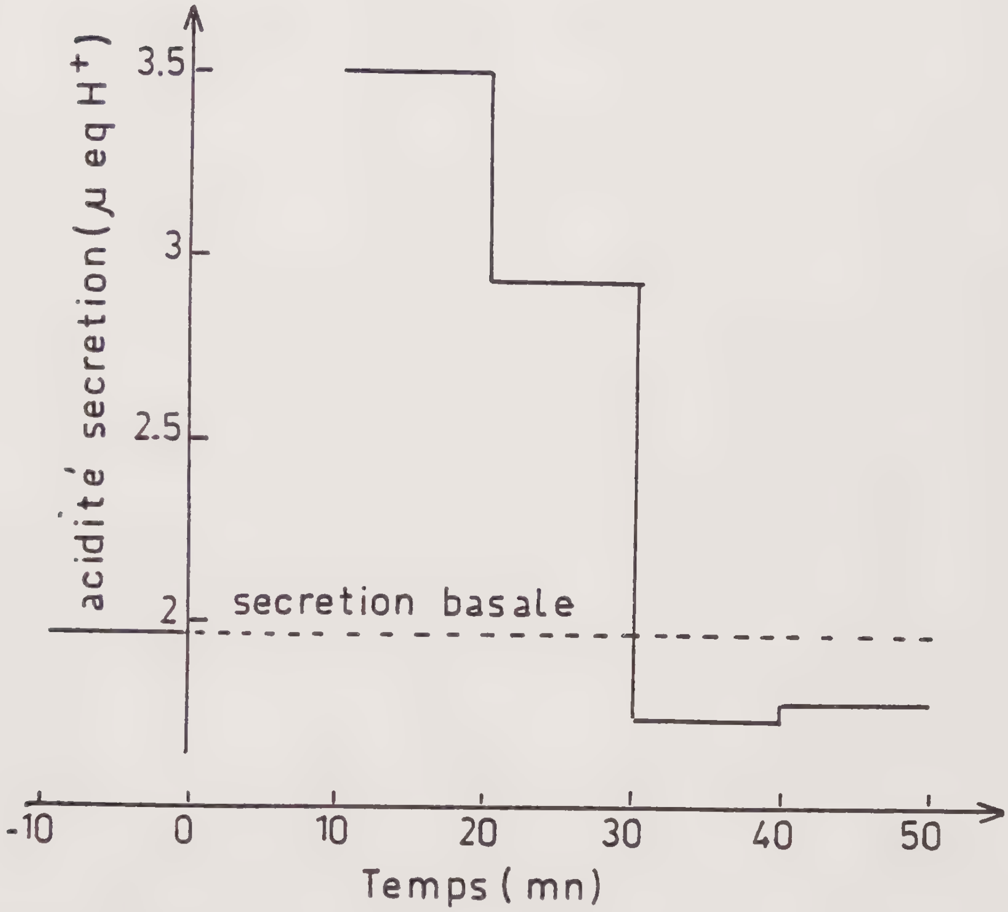
III.7.3.2.1 - Dosage de l'acidité

L'acidité des différentes fractions collectées a été dosée par de la soude N/1000. Elle est représentée sur la figure 52. Le dosage de la secrétion basale recueillie pendant un même intervalle de temps avant l'injection du composé marqué permet de constater que le produit injecté a bien stimulé la secrétion gastrique acide.

III.7.3.2.2 - Analyse par HPLC des composés secrétés

Chaque fraction collectée a été analysée par chromatographie HPLC sur une colonne analytique de Partisil 10-ODS-2 éluée par le mélange Acétonitrile-Acétate d'ammonium 0,05 M pH 4,7 (35,6/64,4 v/v) à un débit de 1,2 ml/mn (système chromatographique III). La radioactivité I^{125} de l'éluat recueilli toutes les minutes a été mesurée.

La figure 53 représente les profils de radioactivité obtenus avec les trois fractions de lavage 10-20ème mn, 20-30ème mn, et 40-50ème mn après injection de l'Hexagastrine monoiodée. La fraction de lavage 30-40ème mn présente le même profil d'élution en radioactivité que celui de la dernière fraction collectée (40-50ème mn).



<u>Figure 52</u> - Mesure de l'acidité de la sécretion gastrique après injection de monoiodohexagastrine .

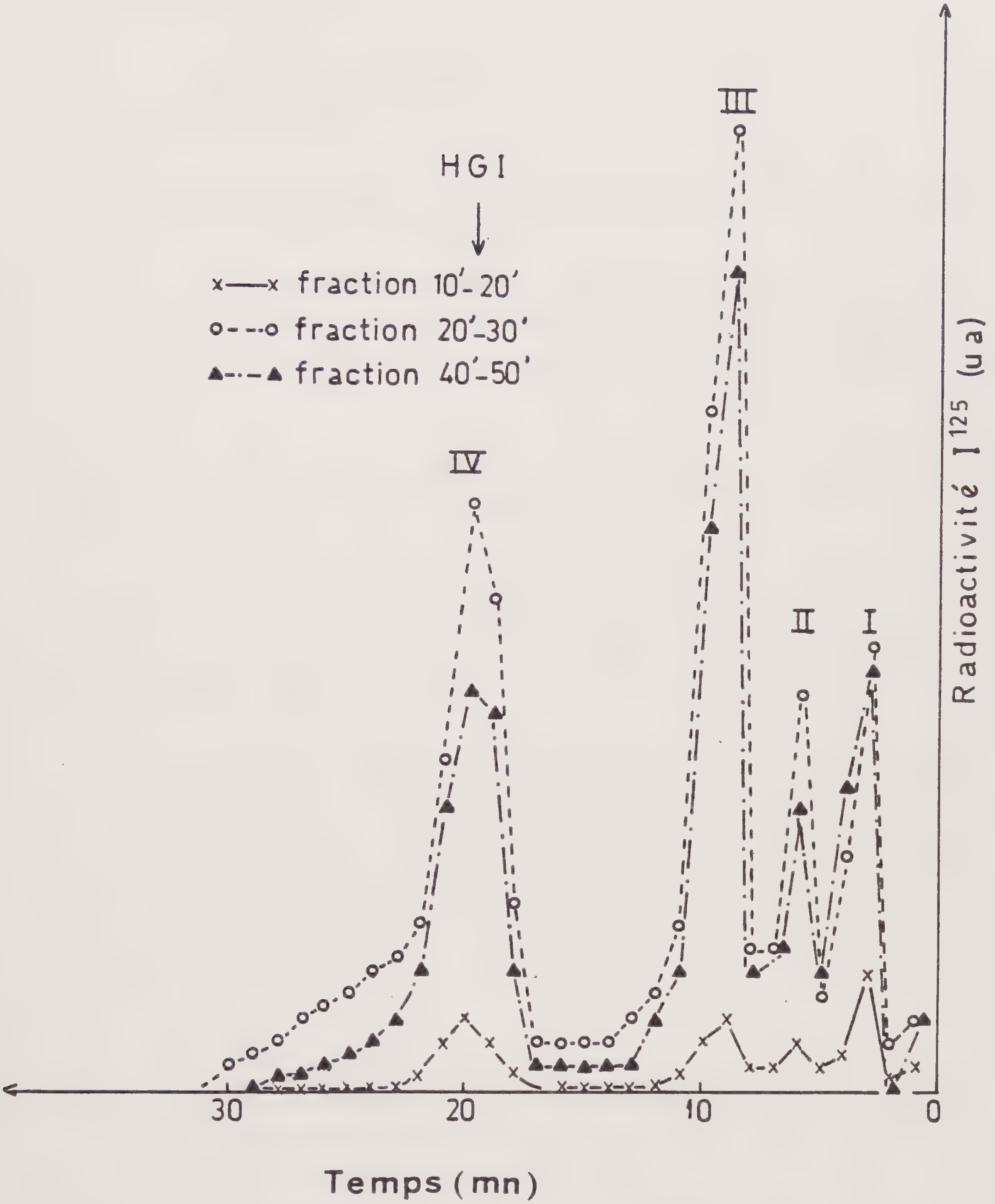


Figure 53 - Profils d'élution par chromatographie HPLC sur colonne analytique Partisil 10-ODS-2 des 3 fractions de lavage 10'-20' (x) , 20'-30' (o) et 40'-50' (△) après injection de HGI^{125} .
éluant : $ACN/AcNH_4$ 0.05M pH 4.75 (35.6/64.4) - 1.2 ml/mn
détection : radioactivité ^{125}I .

Ces profils montrent principalement quatre pics de radioactivité gamma :

- le pic I, sortant dans le volume mort de la colonne correspond à des iodures libres ;

- le pic IV correspond à HGI (Tr =19,6 mn) alors que les pics II et III, bien que non identifiés précisément, correspondent probablement à des peptides iodés provenant de la dégradation de HGI.

Ces quatre pics restent en proportions à peu près constantes pendant tout le lavage.

L'analyse par HPLC a donc permis de constater que le peptide monoiodé HGI^{125} injecté par voie intraveineuse est récupéré après 20 minutes dans la lumière gastrique avec des iodures et des peptides iodés.

Les iodures proviennent probablement de la déshalogénation catalytique de HGI au niveau de la muqueuse gastrique (et très peu au niveau de la circulation sanguine car l'on ne voit pas d'accumulation de radioactivité au niveau de la thyroïde pendant les 45 minutes qui suivent l'injection alors que les iodures injectées dans le sang se fixent sur cet organe dès leur administration).

Les deux peptides iodés peuvent provenir de la dégradation de HGI non seulement au niveau de la muqueuse de l'estomac (coupure de Boc-Tyr(I),par ex.) mais également dans la lumière gastrique où la pepsine coupe la liaison - Trp-Met - des peptides gastriniques / 72 /. Les deux dérivés iodés observés pourraient ainsi être Boc-Tyr(^{125}I) et Boc-Tyr(^{125}I)-βAla-Trp.

Si l'on compare, fraction par fraction, les résultats obtenus par HPLC et ceux du dosage de l'acide gastrique, on constate que la quantité de H^+ secrété est maximale dans la

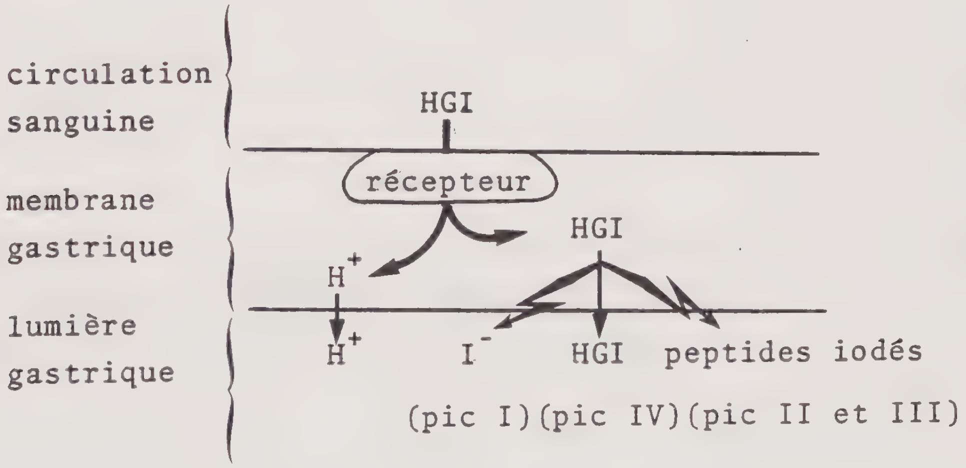
première fraction 10-20ème mn alors qu'il n'y a pas encore (ou très peu) de peptides iodés (HGI et dérivés) recueillis dans l'estomac, il n'y a plus de secrétion de H^+ dans la fraction 40-50ème mn alors que la quantité de peptides iodés est encore importante.

Ceci suggère que HGI stimule bien la secrétion d'acide sous sa forme intacte et qu'elle ne passe qu'ensuite des cellules réceptrices à la lumière gastrique en subissant pendant ce transport certaines dégradations (déshalogénation, hydrolyses enzymatiques) .

La quantité totale de secrétion acide que l'on a recueilli icipar l'injection chez un rat de 0,1 nmole de HGI, correspondant donc à la dose 0,3 nmole/kg, est de 2,5 eq.H^+/ 40 mn, ce qui concorde avec la secrétion théorique stimulée par la PG à cette dose.

Ce résultat et les proportions constantes des 4 pics HPLC confirment bien l'hypothèse précédente.

Le métabolisme de HGI ainsi observé peut être schématisé comme ci-dessous :



III.7.3.3 - Comparaison avec la distribution tissulaire de la Gastrine G.17 diiodée

Une étude scintigraphique semblable a été réalisée antérieuremement / 17 / pour étudier la distribution tissulaire de la Gastrine G.17 diiodée , dans des conditions expérimentales identiques.

Nous avions alors obtenu les résultats suivants :

- fixation , dès les premières minutes de l'expérience, de la radioactivité sur l'estomac et sur les reins.
- disparition de l'image de l'estomac après 10 minutes mais persistance de la fixation rénale même 3h 30 mn après l'injection .
- apparition progressive d'iodures sur la thyroîde après 30 minutes .

Cette fixation rénale de la Gastrine G.17 également observée par différents auteurs / 58, 35, 54 / leur a suggéré que les reins pouvaient jouer un rôle important .Cependant les avis sont partagés quant au rôle précis de cet organe : il pourrait soit contenir des récepteurs gastriniques spécifiques soit intervenir dans la dégradation de la Gastrine iodée .

La fixation d'iodures sur la thyroîde après l'injection de Gastrine diiodée reflète une deshalogénation probable , tout au moins partiellement ,de l'hormone. Cette observation est à rapprocher des résultats obtenus dans l'étude biologique de l'hexagastrine diiodée dont l'activité n'apparaissait que tardivement , comme si ce peptide subissait tout d'abord une désiodation donnant l'analogue monoiodé actif.

La différence de distribution tissulaire entre la Gastrine diiodée et l'Hexagastrine monoiodée montre en tout cas que ces deux substances ont des métabolismes différents .

CHAPITRE IV

CONCLUSION

IV - CONCLUSION

La voie que nous avons suivie dans la recherche d'anti-secrétoires H^+ et plus précisément d'antagonistes de la Pentagastrine s'est avérée fructueuse puisque par modification des résidus tryptophanyle et aspartyle, résidus qui semblaient avoir un rôle important pour l'activité biologique du peptide, nous avons pu obtenir plusieurs inhibiteurs de la secrétion gastrique acide dans les conditions expérimentales utilisées .

Grâce aux études conformationnelles par dichroïsme circulaire nous avons pu savoir si l'inhibition observée pouvait être due à une compétition directe du dérivé au niveau du récepteur de la Pentagastrine (cas de PGNPS, PGPS, PG-Hist) ou si un métabolisme du dérivé était probablement nécessaire pour obtenir l'inhibition de secrétion (cas de PGAsu).

Le dérivé PGPS nous a permis de démontrer que le groupe NO_2 n'est pas impliqué, par son électronégativité ou sa capacité à former des liaisons hydrogène, dans le pouvoir inhibiteur de la PGNPS. Pour déterminer plus précisément les raisons de cet antagonisme, il serait intéressant d'examiner notamment le rôle de l'atome de S du thioéther ainsi que l'influence de l'encombrement et de l'aromaticité du substituant en C_2 du noyau indole.

Quant au dérivé PG-Hist, non seulement antagoniste de la Pentagastrine mais également de l'Histamine, il pourrait, notamment par des études de liaison à des récepteurs isolés spécifiques de chacun des deux stimulants, contribuer à confirmer l'un ou l'autre des schémas de mécanismes d'action des trois

principaux médiateurs de la secrétion gastrique acide : le schéma séquentiel ou le schéma parallèle. Lorsque l'on pourra disposer de tels récepteurs, la recherche d'antagonistes compétitifs de la Gastrine et l'étude de l'interaction hormone-récepteur pourra alors être largement développée.

D'autre part, si la Pentagastrine est depuis longtemps utilisée en remplacement de la Gastrine, par mesure de simplicité et d'économie, les études physiologiques de liaison ou de radioimmunoessais utilisent toujours les analogues marqués de l'hormone G.17. Nous avons maintenant à notre disposition des analogues de la Pentagastrine hautement radioactifs, soit tritié (aucun marquage au tritium de la Pentagastrine n'avait permis d'obtenir jusqu'à présent une radioactivité spécifique aussi élevée) soit marqué à l'Iode 125 qui conservent les propriétés biologiques et immunologiques du pentapeptide et permettront des études plus spécifiques du récepteur.

La méthode de marquage à l'Iode 125 mise au point pour l'Hexagastrine peut également être étendue à tout autre peptide contenant un résidu Méthionyle sensible à l'oxydation .

CHAPITRE V

BIBLIOGRAPHIE

/ 1 / ABILLON A., PHAM VAN CHUONG P., FROMAGEOT P.
Int. J. Peptide Protein Res. 17, 480-485 (1981).

/ 2 / ANDERSON G.W., ZIMMERMAN J.E., CALLAHAN F.M.
J. Am. Chem. Soc. 89, 5012-5017 (1976).

/ 3 / ANDERSON G.W.
In : "Peptides : Chemistry and Biochemistry"
(B. Weinstein and S. Lande, eds), Dekker, New York, 255-266 (1970).

/ 4 / ARNSTEIN H.R.V., MORRIS D.
Biochem. J. 76, 357 (1960).

/ 5 / ASH A.S.F., SCHILD H.O.
Brit. J. Pharmacol. 27, 427-439 (1966).

/ 6 / BASSIRI R.M., UTIGER R.D.
Endocrinology, vol. 90, 722 (1972).

/ 7 / BAUR S., BACON V.C., ROSENQUIST G.L.
Analytical Biochemistry 87, 71-76 (1978).

/ 8 / BECKETT A.H.
Ann. N.Y. Acad. Sci. (2), 144, 675-688 (1967).

/ 9 / BEERS W.H., REICH E.
Nature 228, 917-922 (1970).

/ 10 / BERSON S.A., YALOW R.S.
Gastroenterology 60, 215-222 (1971).

/ 11 / BLACK J.W., DUNCAN W.A.M., DURANT C.J., GANELLIN C.R., PARSONS E.M.
Nature 236, 385-390 (1972).

/ 12 / BLACK J.W., DURANT C.J., EMMETT J.C., GANELLIN C.R.
Nature 248 (5443), 65-67 (1974).

/ 13 / BOCCU E., VERONESE F.M., FONTANA A., BENASSI C.
Eur. J. Biochem. 13, 188 (1970).

/ 14 / BODANSKY M., TOLLE J., DESHMANE S., BODANSKY A.
Int. J. Pept. Protein Res. 12, 57-68 (1978).

/ 15 / BRITTAIN R.T., JACK D., BRICE B.J.
TIPS, 310-313 (1981).

/ 16 / CASCONE O., BISCOGLIO de JIMENEZ BONINO M.J., SANTOME J.A.
Int. J. Peptide Protein Res. 16, 299-305 (1980).

/ 17 / CHARON M.H.
DEA Interactions moléculaires en Biochimie (1980).

/ 18 / CHISOLM G.M., SILA C.A., HMIEL S.P.
Analytical Biochemistry 111, 212-213 (1981).

/ 19 / CODE C.F.
Fed. Proc. 24, 1311-1321 (1965).

/ 20 / DEBONS F.E., LOUDON G.M.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 92 (2), 606-609 (1980).

/ 21 / DOCKRAY G.J., WALSH J.H., GROSSMAN M.I.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69 (2), 339-345 (1976).

/ 22 / DUBRASQUET M., ORY-LAVOLLEE L., PHAM VAN CHUONG P., MORGAT J.L., FROMAGEOT P., BONFILS S.
Gastroentérol. Clin. Biol. 4, 786-792 (1980).

/ 23 / DURANT C.J., GANELLIN C.R., PARSONS E.M.
J. Med. Cham. 18, 905-909 (1975).

/ 24 / DUTTA A.S., MORLEY J.S.
Proc. XIVth European Peptide Symp., Wepion, Presses Universitaires, Brussels, 517-522 (1976).

/ 25 / EDELHOCH H.
J. Biol. 237 (9), 2778 (1962).

/ 26 / EDKINS J.S.
Proc. Roy. Soc. B 76, 376 (1905).

/ 27 / Mac FARLANE A.S.
Nature 182, 53 (1958).

/ 28 / FONTANA A., MARCHIORI F., ROCCHI R., PAJETTA P.
Gazz. Chim. Ital. 96, 1302-1312 (1966).

/ 29 / FONTANA A., SCOFFONE E., BENASSI C.A.
Biochem. 7, 980 (1980).

/ 30 / FRAKER P.J., SPECK J.C.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 849-857 (1978).

/ 31 / GANGULI S.H., HUNTER W.M.
CIBA Fundation Symposium, Edimbourg, 54 (1970).

/ 32 / GHOSH M.H., SCHILD H.D.
Bri. J. Pharmac. 13, 54-61 (1958).

/ 33 / GILLARD R.D., HAY R.W., LAURIE S.H.
In : Aminoacids, Peptides and Proteins. The Chem. Soc., London, vol. 5, 448-475 (1974).

/ 34 / GIRMA J.P.,MORGAT J.L., FROMAGEOT P., DUBRASQUET M., ACCARY J.P., VATIER J., BONFILS S.
Biochimie 56 (5), 763 (1974).

/ 35 / GIRMA J.P.
Thèse Doctorat d'Etat - AO 12550 (1976).

/ 36 / GREGORY H., HARDY P.M., JONES D.S., KENNER G.W., SHEPPARD R.C.
Nature (London), 204, 931 (1964).

/ 37 / GREGORY R.A., TRACY H.J.
Gut. 5, 103 (1964).

/ 38 / GREGORY R.A., TRACY H.J.
Lancet 2, 797-799 (1972).

/ 39 / GROSSMAN M.I., KONTUREK S.J.
Gastroentérology 66, 517-521 (1974).

/ 40 / Mac GUIGAN M.D.
Gastroentérology 54 (6), 1005 (1968).

/ 41 / HAYWARD C.F., MORLEY J.S.
In : Peptides 1974. Proc. XIIIth European Peptide Symposium, Kyriat Anavim, Y. Wolman, ed., Israel University Press, 287 (1975).

/ 42 / HIGAKI K., DANNO T., MIYOSHI M.
Pharmacomatrics 8(2), 147-155 (1974).

/ 43 / HOPKINS P.B., FUCHS P.L.
J. Org. Chem. 43, n° 6, 1206-1217 (1978).

/ 44 / HUBACHER M.H.
In : Organic Synthesis, Neller C.R. ed., J. Wiley and Sons Inc., N.Y., vol. XV, 45-47 (1935).

/ 45 / HUNTER W.M., GREENWOOD F.C.
Nature, 19, 495 (1962).

/ 46 / Mac INTOSH F.C.
Q.J. Exp. Physiol., 27-28 (1938).

/ 47 / KIER L.B.
Mol. Pharmac. 3 (5), 487-494 (1967).

/ 48 / KIER L.B.
J. Med. Chim. 11, 441-445 (1968).

/ 49 / KIER L.B.
J. Pharm. Sci., 59 (1), 112-114 (1970).

/ 50 / KISFALUDY L., SCHON I., NAFRADI J., VARGA L., VARRO V.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 887 (1978).

/ 51 / KISFALUDY L.
In : Peptides 1978. Siemion I.Z. and Kupryszewki G. eds., Wroclaw University Press, 25 (1979).

/ 52 / KONIG W., GEIGER R.
Chem. Ber. 103, 788-798 (1970).

/ 53 / LAI K.S.
Gut. 5, 327-333 (1964).

/ 54 / LANCIAULT G., GISLON J., ACCARA J.P., BONFILS S.
Proc. of Soc. Exp. Biol. Med. 148, 1081 (1975).

/ 55 / LECHER H., HOLSCHNEIDER F.
Chem. Ber. 57, 755 (1924).

/ 56 / LEWIN M.J.M., SOUMARMON A., BONFILS S.
Progress in Gastroenterology, vol. III, ed. by G.B. Jerzy, M.D. Gloss. FACP by Grune et Statton Inc., 203-240 (1977).

/ 57 / LIN T.
Gastroenterology 63, 922-923 (1972).

/ 58 / LUNQVIST H., GUSTAVSSON S., LUNQVIST G.
Eur. Surg. Res., 1-12 (1978).

/ 59 / MAHADEVAPA D.S., JADHAV M.B., NAIDU H.M.K.
React. Kinet. Catal. Lett., vol. 14 (1), 15-20 (1980).

/ 60 / MAKHLOUF G.M.
In : International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics. Ed. by P. Holton, Pergamon Press, Sect. 39A, 173-174 (1973).

/ 61 / MARCHALONIS J.J.
Biochem. J. 113, 299 (1969).

/ 62 / MARCHE P., GIRMA J.P., MORGAT J.L., FROMAGEOT P., GHELIS C., DUBRASQUET M., BONFILS S.
Eur. J. Biochem. 50, 375-382 (1975).

/ 63 / MARTINEZ J., BODANSKY M.
Int. J. Pept. Protein Res. 12, 277-283 (1978).

/ 64 / MORGAT J.L., DESMARES J., CORNU M.
Journal of Labelled Compounds XI, 257 (1975).

/ 65 / MORLEY J.S.
Proc. Roy. Soc. B 170, 97-111 (1968).

/ 66 / MORLEY J.S.
J. Chem. Soc. (C) 809 (1969).

/ 67 / MORLEY J.S.
In : Hormonal receptors in digestive tract physiology.
Ed. by S. Bonfils, P. Fromageot, G. Rosselin.
Elsevier/North Holland Biomedical Press, 3-11 (1977).

/ 68 / ORR W.L., KHARASCH N.
J. Am. Chem. Soc. 75, 6030 (1953).

/ 69 / ORY-LAVOLLEE L.
Thèse Doctorat en Pharmacie n° 46 (1981).

/ 70 / PARISH C.R., STANLEY P.
Immunochemistry 9, 853-872 (1972).

/ 71 / PENKE B., ZARANDI M., PHAM P., TOTH G.K. , KOVACS K., FEKETE M., TELEGDY G.
XVII th Eur. Peptide Symp., Prague (1982). A paraître.

/ 72 / PHAM VAN CHUONG P., MORGAT J.L., FROMAGEOT P., DUBRASQUET M., ORY-LAVOLLEE L., BONFILS S.
In : Hormone receptors in digestion and nutrition.
G. Rosselin, P. Fromageot and S. Bonfils, eds.
Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 157-163 (1979).

/ 73 / PHAM VAN CHUONG P., PENKE B., DE CASTIGLIONE R., FROMAGEOT P..
In : Hormone receptors in digestion and nutrition.
Ed. by G. Rosselin, P. Fromageot and S. Bonfils.
Elsevier/North Holland Biomedical Press, 33-44 (1979).

/ 74 / RIVIERE R., MORUCCI J.P., DUTHEIL M., KELLERSSOHN C.
J. de Biologie et de Médecine Nucléaires VI.A, 17-27 (1971).

/ 75 / ROSA U.
Proc. Conf. on methods of preparing and storing marked molecules, Bruxelles. EUR-1625, 915-930 (1963).

/ 76 / SCHECHTER Y., BURSTEIN V., PATCHORNICK A.
Biochemistry 14, 4497-4503 (1975).

/ 77 / SCHON I., KISFALUDY L., HOLZINGER G., VARGA L.
In : Peptides 1980 (16th European peptide Symposium). Ed. Brunfeld, Copenhagen (1981).

/ 78 / SCOFFONE E., FONTANA A., ROCCHI R.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 25, 170 (1966).

/ 79 / SCOFFONE E., FONTANA A., ROCCHI R.
Biochemistry 7, 971 (1968).

/ 80 / SHEPPARD R.C.
In : Molecular Endocrinology. Mac Intyre I et Szelke M. eds. Elsevier/North Holland Biomedical Press, N.Y., 43-56 (1977).

/ 81 / SONODA S., SCHLAMOWITZ M.
Immunochemistry. Pergamon Press, vol. 7, 885-898 (1970).

/ 82 / SOUMARMON A., LEWIN M., DUBRASQUET M., BONFILS S., GIRMA J.P., MORGAT J.L., FROMAGEOT P.
In : Hormonal receptors in digestive tract physiology. Ed. by S. Bonfils, P. Fromageot, G. Rosselin. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 404 (1977).

/ 83 / STADIL F., REHFELD J.F.
Scan J. Clin. Lab. Inves. 30, 361-368 (1972).

/ 84 / STAGG B.H., TEMPERLEY J.M., ROCHMAN H., MORLEY J.S.
Nature 228, 58-59 (1970).

/ 85 / TRACY H.J., GREGORY R.A.
Nature 204, 931-938 (1964).

/ 86 / WEYGANG F., HOFFMANN D., WUNSCH E.
Z. Naturforsch. Teil B 21, 426-428 (1966).

/ 87 / WIELAND T., SARGES R.
Liebigs Ann. Chem. 658, 181-193 (1962).

/ 88 / WUNSCH E., DREES F.
Chem. Ber. 99, 110-120 (1966).

/ 89 / YALOW R.S., BERSON S.A.
Gastroenterology 58, 1-14 (1970).

/ 90 / YALOW R.S., WU N.
Gastroenterology 65, 19-21 (1973).

/ 91 / YALOW R.S., STRAUS E.
In : Hormonal receptors in digestive tract physiology.
Ed. by Bonfils S.,Fromageot P., Rosselin G.
Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam,
79-93 (1977).

/ 92 / YANAIHARA C., YANAIHARA N., SHIMIZU F., SATO H.,
UEHATA S., IMAGAWA K.
Biomedical Research 1, 242-247 (1980).

/ 93 / ZERVAS L., HAMALIDIS G.
J. Am. Chem. Soc. 87, 99 (1965).

/ 94 / ZINCKE T.
Ber. 44, 770 (1911).

CHAPITRE VI

RESUME

RÉSUMÉ

L'étude des relations structure-activité de la Gastrine, hormone polypeptidique du tractus digestif, impliquée notamment dans la régulation de la secrétion gastrique acide, a pour objectif de mieux comprendre son mécanisme d'action. Dans ce but nous avons développé deux aspects de cette étude :

- d'une part nous avons recherché, par analogie structurale, des antagonistes de la Pentagastrine, segment actif de l'hormone, qui permettront de mieux définir les sites de l'hormone responsables de sa fixation à son récepteur spécifique et ceux impliqués dans le déclenchement de son activité biologique ;
- d'autre part nous avons synthétisé des analogues radioactifs de la Pentagastrine qui permettront des études de liaison de ce peptide ou de ses analogues à son récepteur ou à des anticorps, ainsi que des études de distribution tissulaire.

Pour rechercher des antagonistes compétitifs de la Pentagastrine quatre dérivés ont été étudiés : les deux premiers, l'o-nitrophénylsulfényl-Pentagastrine (PGNPS) et la phénylsulfényl-Pentagastrine (PGPS) proviennent de modifications du résidu tryptophanyle de la Pentagastrine tandis que les deux autres, l'aminosuccinyl^{4}Pentagastrine (PGAsu) et la Pentagastrine-Histamine (PG-Hist) dérivent de modifications du résidu aspartyle.

Pour chacun de ces dérivés nous avons étudié les meilleures conditions de synthèse et de purification et une étude

conformationnelle par dichroïsme circulaire nous a permis de savoir s'ils pourraient éventuellement présenter la conformation nécessaire pour être antagonistes de la PG. Cette analyse doublée de mesures de l'activité biologique de ces dérivés a abouti aux résultats suivants :

- l'antagonisme équivalent obtenu vis-à-vis de la Pentagastrine par la PGNPS et la PGPS permet de conclure que cette propriété est indépendante du groupement nitré du premier dérivé et est due probablement à l'encombrement des noyaux NPS et PS qui empêcheraient l'accessibilité du récepteur à un groupement du peptide important pour le déclenchement de l'activité biologique.

- la PGAsu inhibant aussi la Pentagastrine présente une conformation en solution difficilement compatible avec une fixation au récepteur de laPG. Elle est donc sans doute métabolisée et c'est un produit de sa dégradation qui inhiberait la secrétion stimulée par la Pentagastrine.

- quant au dérivé PG-Hist il s'avère non seulement antagoniste de la PG mais également de l'Histamine. Ce dérivé à double propriété est un outil prometteur pour expliquer la relation entre Gastrine et Histamine dans la régulation de la sécrétion gastrique acide.

Une étude complémentaire de ces antagonistes a d'autre part été amorcée par la synthèse de l'immunogène PGNPS-Hist-Benzidine-BSA préparé dans le but d'obtenir des anticorps spécifiques de la PGNPS, substances nécessaires à l'étude du métabolisme in vivo de ce dérivé.

Deux analogues hautement radioactifs de la Pentagastrine ont été préparés soit par tritiation catalytique d'Hexagastrine diiodée (r.a.s. obtenue : 45 Ci/mmole) soit par marquage à l'Iode 125 de l'Hexagastrine (r.a.s. HGI^{125} ≅ 1 000 Ci/mmole).

Dans le premier cas l'Hexagastrine tritiée obtenue conserve les propriétés biologiques et radioimmunologiques de l'Hexagastrine.

Dans le deuxième cas, une étude biologique et radio-immunologique préliminaire sur les différents dérivés iodés et/ou oxydés de l'Hexagastrine nous a conduit à rechercher les meilleures conditions de marquage à l'Iode 125 par la Chloramine T pour obtenir le dérivé monoiodé non oxydé, seul capable de conserver les propriétés de l'hormone. Le dérivé HGI^{125} obtenu a permis de réaliser une étude de sa distribution tissulaire, chez le rat, par scintigraphie.